

**Hormonrezeptorbestimmungen
in Mamma-, Ovarial- und Korpuskarzinomen
unter besonderer Berücksichtigung
immunchemischer Nachweismethoden**

Doreen Mautner

München 1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554619_0078

Aus der Frauenklinik im Klinikum Großhadern
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. H. Hepp

**Hormonrezeptorbestimmungen
in Mamma-, Ovarial- und Korpuskarzinomen unter besonderer
Berücksichtigung immunchemischer Nachweismethoden**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Doreen Mautner

aus
München
Jahr
1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

PD Dr. W. Eiermann

Mitberichterstatter:

1. Prof. Dr. H. Hepp

2. Prof. Dr. M. Klingenberg

Dekan:

Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

30.07.87

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	5
1.1 Biologische Bedeutung der Hormonrezeptoren für Mamma-, Ovarial- und Korpuskarzinom	5
1.1.1 Mammakarzinom	6
1.1.2 Ovarialkarzinom	7
1.1.3 Korpuskarzinom	9
1.2 Methodik der Hormonrezeptorbestimmung	11
1.2.1 Übersicht	11
1.2.2 DCC-Assay	12
1.2.2.1 Handhabung der Gewebeproben	12
1.2.2.2 Inkubation des Cytosols	12
1.2.2.3 Trennung des proteingebundenen vom freien Steroid	13
1.2.2.4 Bestimmung der Rezeptorquantität	13
1.2.2.5 Proteinbestimmung	15
1.2.3 Monoklonale Antikörper gegen das Östrogenrezeptorprotein	16
1.2.3.1 Enzymimmunoassay	18
1.2.3.1.1 Inkubation des Cytosols	18
1.2.3.1.2 Trennung der Rezeptoren vom Cytosol	18
1.2.3.1.3 Bestimmung der Rezeptorquantität	19
1.2.3.2 Immunocytochemischer Assay	20
1.2.3.2.1 Vorbereitung der Gewebeproben	20
1.2.3.2.2 Inkubation der Gewebeproben	20
1.2.3.2.3 Bestimmung der Rezeptorquantität	21
2. ERGEBNISSE	24
2.1 Mammakarzinom	24
2.1.1 Meßwertvergleich Enzymimmunoassay - DCC-Assay für die Östrogenrezeptorbestimmung bei frisch hergestellten Tumorcytosolen	24

2.1.2	Meßwertvergleich Enzymimmunoassay - DCC-Assay für die Östrogenrezeptorbestimmung bei tiefgefrorenen Tumorcytosolen	25
2.1.3	Korrelation Enzymimmunoassay - DCC-Assay quantitativ für frische und tiefgefrorene Tumorcytosole	26
2.1.4	Korrelation Enzymimmunoassay - DCC-Assay quantitativ für frische Tumorcytosole	27
2.1.5	Korrelation Enzymimmunoassay - DCC-Assay quantitativ für tiefgefrorene Tumorcytosole	28
2.1.6	Korrelation Enzymimmunoassay - DCC-Assay qualitativ für frische und tiefgefrorene Tumorcytosole	29
2.1.7	Meßwertvergleich für die Östrogenrezeptorbestimmung an frischen und tiefgefrorenen Tumorcytosolen im Enzymimmunoassay	31
2.1.8	Korrelation frisches - tiefgefrorenes Tumorcytosol quantitativ für den Enzymimmunoassay	32
2.1.9	Enzymimmunoassay bei Er-negativen und PR-positiven (DCC-Assay) tiefgefrorenen Tumorcytosolen	33
2.1.10	Beispiele für den Östrogenrezeptornachweis mit dem immunocytochemischen Assay	35
2.1.11	Korrelation Enzymimmunoassay - immunocytochemischer Assay	36
2.1.12	Korrelation DCC-Assay - immunocytochemischer Assay	37
2.2	Ovarialkarzinom	38
2.2.1	Steroidrezeptorverteilung (ER, PR) im DCC-Assay	38
2.2.2	Steroidrezeptorverteilung (ER, PR) und histologischer Typ	39
2.2.3	Steroidrezeptorverteilung (ER, PR) und Differenzierungsgrad	41
2.2.4	Meßwertvergleich Enzymimmunoassay - DCC-Assay für die Östrogenrezeptorbestimmung bei frisch hergestellten Tumorcytosolen	42
2.2.5	Meßwertvergleich Enzymimmunoassay - DCC-Assay für die Östrogenrezeptorbestimmung bei tiefgefrorenen Tumorcytosolen	43
2.2.6	Korrelation Enzymimmunoassay - DCC-Assay quantitativ für frische und tiefgefrorene Tumorcytosole	44

2.2.7	Korrelation Enzymimmunoassay - DCC-Assay quantitativ für frische Tumorcytosole	45
2.2.8	Korrelation Enzymimmunoassay - DCC-Assay quantitativ für tiefgefrorene Tumorcytosole	46
2.2.9	Korrelation Enzymimmunoassay - DCC-Assay qualitativ für frische und tiefgefrorene Tumorcytosole	47
2.2.10	Meßwertvergleich für die Östrogenrezeptorbestimmung an frischen und tiefgefrorenen Tumorcytosolen im Enzymimmunoassay	49
2.2.11	Korrelation frisches - tiefgefrorenes Tumorcytosol quantitativ für den Enzymimmunoassay	50
2.2.12	Beispiele für den Östrogenrezeptornachweis mit dem immunocytochemischen Assay	51
2.2.13	Korrelation Enzymimmunoassay - immunocytochemischer Assay	52
2.2.14	Korrelation DCC-Assay - immunocytochemischer Assay	53
2.3	Korpuskarzinom	54
2.3.1	Meßwertvergleich Enzymimmunoassay - DCC-Assay für die Östrogen- und Progesteronrezeptorbestimmung und Differenzierungsgrad	54
2.3.2	Beispiele für den Östrogenrezeptornachweis mit dem immunocytochemischen Assay	55
2.3.3	Korrelation Enzymimmunoassay - immunocytochemischer Assay	56
2.3.4	Korrelation DCC-Assay - immunocytochemischer Assay	57
2.4	Gesamtvergleich für alle untersuchten Tumoren	58
2.4.1	Korrelation Enzymimmunoassay - DCC-Assay quantitativ für frische und tiefgefrorene Tumorcytosole	58
2.4.2	Korrelation Enzymimmunoassay - DCC-Assay quantitativ für frische Tumorcytosole	59
2.4.3	Korrelation Enzymimmunoassay - DCC-Assay quantitativ für tiefgefrorene Tumorcytosole	60

2.4.4	Korrelation Enzymimmunoassay - DCC-Assay qualitativ für frische und tiefgefrorene Tumorzytosole	61
2.4.5	Korrelation frisches - tiefgefrorenes Tumorzytosol quantitativ für den Enzymimmunoassay	63
2.4.6	Korrelation Enzymimmunoassay - immunocytochemischer Assay	64
2.4.7	Korrelation DCC-Assay - immunocytochemischer Assay	65
3.	DISKUSSION	66
3.1	Mammakarzinom	66
3.1.1	Vergleich Enzymimmunoassay und DCC-Assay	66
3.1.2	Vergleich immunocytochemischer Assay, Enzymimmunoassay und DCC-Assay	71
3.2	Ovarialkarzinom	74
3.2.1	Steroidrezeptoren in Ovarialkarzinomen	74
3.2.2	Steroidrezeptoren in Abhängigkeit vom histologischen Typ	76
3.2.3	Steroidrezeptoren und Differenzierungsgrad	78
3.2.4	Vergleich Enzymimmunoassay und DCC-Assay	79
3.2.5	Vergleich immunocytochemischer Assay, Enzymimmunoassay und DCC-Assay	82
3.3	Korpuskarzinom	85
3.3.1	Steroidrezeptoren in Korpuskarzinomen	85
3.3.2	Vergleich immunocytochemischer Assay, Enzymimmunoassay und DCC-Assay	86
3.4	Gesamtvergleich für den Rezeptornachweis bei allen Karzinomen	88
3.4.1	Vergleich Enzymimmunoassay und DCC-Assay	88
3.4.2	Vergleich immunocytochemischer Assay, Enzymimmunoassay und DCC-Assay	90
4.	ZUSAMMENFASSUNG	92
5.	LITERATURVERZEICHNIS	94

1. EINLEITUNG

1.1 Biologische Bedeutung der Hormonrezeptoren für Mamma-, Ovarial- und Korpuskarzinom

Die Interaktion eines Steroidhormons mit cytosolischen Rezeptoren wird als das Primärereignis der hormonellen Wirkung in steroidabhängigen Geweben angesehen (Gorski et al., 1968). Rezeptorbestimmungen haben sich in der klinischen Praxis als nützlich für die Behandlung des Mammakarzinoms erwiesen (Allegra et al., 1980). Dabei ist der Nachweis cytosolischer Östrogen- und Progesteronrezeptoren mit günstigen Ansprechraten der metastasierten Erkrankung auf eine hormonelle Therapie und günstigeren Überlebenszeiten korreliert.

Die Bedeutung beider Rezeptortypen in neoplastischem Gewebe des weiblichen Genitaltrakts ist der Gegenstand einer Reihe von Untersuchungen in jüngster Zeit. Man konnte eine Verbindung zwischen dem Vorhandensein des Progesteronrezeptors beim metastasierten Endometriumkarzinom und den Ansprechraten einer Therapie nachweisen (Young et al., 1976; Siiteri, 1978; Bonte et al., 1981). Das Ovar scheint nicht nur der Produktionsort der Östrogene und Gestagene zu sein, sondern auch ein Zielgewebe für diese Substanzen. Daher ist es anzunehmen, daß einige Ovarialtumoren ebenfalls Steroidrezeptoren enthalten. Es liegen bereits eine Reihe von Untersuchungen über den Rezeptorstatus in benignen und malignen Ovarialtumoren vor (Jänne et al., 1981 a; Schwartz et al., 1982 a). Einige Arbeitsgruppen berichteten über Remissionen des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms auf eine hormonelle Therapie (Myers et al., 1981; Schwartz et al., 1982 b).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Rezeptorstatus im Mamma-, Ovarial- und Korpuskarzinom unter besonderer Berücksichtigung neuer methodischer Ansätze durch Verwendung monoklonaler Antikörper.

1.1.1 Mammakarzinom

Schon lange ist bekannt, daß einige menschliche Mammakarzinome hormonabhängig sind, da man beobachtet hatte, daß eine Änderung des hormonalen Milieus zum Teil überraschende Remissionen im Krankheitsverlauf brachte. Zu erwähnen sind die Beobachtungen nach Ovariectomie (Beatson, 1896), nach Adrenalektomie (Huggins und Bergenstal, 1952) oder nach Hypophysektomie (Luft und Olivecrona, 1953; Pearson et al., 1956). Auch Studien über die Zufuhr von Androgenen (Nathanson, 1952), hohen Östrogendosen (Haddow et al., 1944) oder Antiöstrogenen wie Tamoxifen (Cole et al., 1971; Ward, 1973) unterstützen die These der hormonellen Beeinflussbarkeit des Mammakarzinoms durch Änderungen des hormonalen Milieus. Doch nur ein Teil der Patientinnen weist hormonabhängige Tumoren auf und reagiert auf ablative oder hormonell additive Maßnahmen mit einer Remission, der andere Teil der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom muß direkt der Chemotherapie zugeführt werden. Deshalb erschien es nötig, Möglichkeiten zu finden, diese beiden Gruppen zu unterscheiden. Die Bestimmung der Steroidrezeptoren im Tumorgewebe hat sich als geeignetes Kriterium herausgestellt.

Den ersten Hinweis auf die Bedeutung der Hormonrezeptoren erbrachten Folca und Mitarbeiter (1961), die zeigten, daß nach parenteraler Applikation von Tritiumöstradiol hormonabhängige Mammakarzinome einen größeren Anteil an Radioaktivität aufnehmen als nicht hormonabhängige Karzinome.

Solche in-vivo Versuche konnten in der Folgezeit mehrfach bestätigt werden (Jensen, 1965; King et al., 1965; Mobbs, 1966). Mit der Entwicklung von in-vitro Techniken zum Studium der Interaktion von Tritiumöstradiol mit Tumorgewebe wurde es möglich den Rezeptorgehalt zu quantifizieren. Dabei zeigte sich, daß Mammakarzinome mit geringer Tritium-östradiolbindung im Cytosol, also niedrigem Östrogenrezeptorgehalt, wenig auf eine endokrine Therapie ansprechen, wohingegen der Großteil der Patientinnen mit hohem Rezeptorgehalt objektive Remissionen durch endokrine Behandlung erwarten kann (Jensen et al., 1971; Maass et al., 1972; Engelsman et al., 1973; Leung et al., 1973; Savlov et al., 1974; Mc Guire et al., 1975). Auch Gestagenrezeptoren erwiesen sich als wichtige Parameter zur Vorhersage des Therapieerfolgs einer endokrinen Behandlung. Patientinnen, bei denen sowohl Östrogen- als auch Progesteronrezeptoren nachgewiesen werden konnten, zeigten eine höhere Remissionsrate nach endokriner Therapie als solche, bei denen nur Östrogenrezeptoren vorhanden waren. Ein Teil der Therapieversager mit positivem Östrogenrezeptor ist möglicherweise auf das Fehlen des Progesteronrezeptors zurückzuführen (Horwitz et al., 1975; Mc Guire, 1978; Eiermann und Eicher, 1981).

1.1.2 Ovarialkarzinom

Eine wirksame Behandlung des Ovarialkarzinoms ist noch immer ein ungelöstes Problem der gynäkologischen Onkologie, sodaß jeder potentielle Parameter zur Vorhersage einer bestimmten Therapieform größter Aufmerksamkeit bedarf. In letzter Zeit wurde häufig über den Nachweis von Östrogenrezeptoren in Ovarialkarzinomen berichtet (Holt et al., 1979; Galli et al., 1981; Creasman et al., 1981; Holt et



al., 1981; Jänne et al., 1980 a; Berqvist et al., 1981; Hamilton et al., 1981; Hahnel et al., 1982; Schwartz et al., 1982 a; Quinn et al., 1982). Diese Rezeptoren entsprechen in Häufigkeit und Verteilung etwa jenen, die im Mammakarzinom gefunden wurden. Jedoch geht bei Ovarialkarzinomen nicht wie bei Mammakarzinomen mit zunehmender Entdifferenzierung die Fähigkeit zur Bildung von Steroidrezeptoren verloren, eine umgekehrte Beziehung ist eher wahrscheinlich (Teufel et al., 1983). Außerdem gibt es mehrere Hinweise in der Literatur auf Tumormarker, die an Gewebsschnitten des Ovarialkarzinoms positiv sind. Teufel und Mitarbeiter (1983) fanden eine Beziehung zwischen Rezeptorstatus und Zytostatikaempfindlichkeit. So wiesen Tumoren mit Remission unter einer Chemotherapie seltener positive Progesteron- oder Östrogenrezeptoren auf als Tumoren mit Progression. Bislang ist jedoch ein idealer Parameter noch nicht bekannt geworden, der Vorhersagen auf den Krankheitsverlauf zulassen könnte, vielleicht ergeben sich Anhaltspunkte für eine endokrine Therapie wie beim progesteronrezeptorpositiven Korpuskarzinom.

Das Oberflächenepithel des Ovarialkarzinoms leitet sich von modifiziertem Mesothel, welches das Ovar bedeckt, ab. Das Ovarialkarzinom zeigt histologische Differenzierungsformen, die den Neoplasmen, die sich aus den Müllerschen Gängen herleiten, ähnlich sind, sodaß man schließen könnte, daß es auch wie jene auf eine Hormontherapie ansprechen sollte (Milwidsky et al., 1980). Aus Kasuistiken könnte man annehmen, daß eine hochdosierte Gestagentherapie in einigen Fällen fortgeschrittener Ovarialkarzinome von Nutzen sein könnte (Ward, 1972; Tobias und Griffiths, 1976). Andere Untersuchungen berichteten über die Wirksamkeit einer antiöstrogenen Therapie bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen (Myers et al., 1981; Schwartz et al., 1982 b). In einer weiteren Studie von Kauppila und Mitar-

beitern (1983) konnte gezeigt werden, daß Patientinnen mit Ovarialkarzinomen, die einen sehr niedrigen Östrogen- oder Progesteronrezeptorgehalt aufweisen, ein kürzeres Überlebensintervall haben. Bislang konnte dies allerdings nicht mit einem bestimmten Rezeptormuster in Verbindung gebracht werden, sodaß kein rationeller Ansatz einer hormonellen Therapie gemacht werden kann.

1.1.3 Korpuskarzinom

Verschiedene Forschungsgruppen haben sich in letzter Zeit mit Östrogen- und Progesteronrezeptoren beim Korpuskarzinom beschäftigt. Man konnte zeigen, daß Hormonrezeptoren, die im Cytoplasma endometrialer Hyperplasien und Karzinome nachgewiesen wurden, die gleichen biochemischen und physikalischen Eigenschaften haben wie die entsprechenden Rezeptoren im Endometrium (Hunter et al., 1980). Darüber hinaus unterliegen die Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowohl im malignen als auch im benignen Endometrium offensichtlich den gleichen Kontrollmechanismen (Jänne et al., 1980 b; Pollow et al., 1980; Mortel et al., 1981). Durch eine Reihe von Untersuchungen ist auch die therapeutische und prognostische Bedeutung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren für das Korpuskarzinom bekannt. Creasman und Mitarbeiter wiesen ein aggressiveres Wachstumsverhalten östrogenrezeptornegativer Tumoren nach (1980). Aus dieser Studie geht hervor, daß die Kenntnis des Rezeptorgehalts ein zusätzlicher bedeutender prognostischer Faktor zum histologischen Grading und der Penetration ins Myometrium beim primären Endometriumkarzinom ist. Ehrlich und Mitarbeiter (1981) zeigten, daß der Nachweis eines cytoplasmatischen Progesteronrezeptors signifikant mit dem Ansprechen auf eine Gestagentherapie beim Korpuskar-

zinom übereinstimmt. Auch Kauppila und Mitarbeiter (1982) konnten eine enge Korrelation zwischen dem Nachweis des Progesteronrezeptors im Cytosol des Endometriumkarzinoms und der Tumorregression unter einer gestagenen Therapie nachweisen.

Dies bedeutet bislang für die Therapie von Rezidiven und Fernmetastasen, die mit den üblichen radiologischen und operativen Maßnahmen nicht mehr anzugehen sind, eventuell den Einsatz hormonaler Maßnahmen. So ist mit einer hochdosierten Gestagentherapie bei dem selektionierten Kollektiv progesteronrezeptorpositiver hochdifferenzierter Adenokarzinome (G I) noch in etwa 40 bis 50 % eine Remission zu erzielen. Progesteronrezeptornegative entdifferenzierte (G III) Neoplasmen werden auf Grund der geringen Ansprechrate endokriner Maßnahmen im Falle des Rezidivs zytostatisch behandelt. Da die meisten progesteronrezeptorpositiven Tumoren auch Östrogenrezeptoren haben, unterstützt dies das Konzept, daß auch der Östrogenrezeptor einen prognostischen Wert besitzt. Es ist zu klären, ob Endometriumkarzinome, in denen nur der Östrogenrezeptor nachgewiesen werden kann, auf eine antiöstrogene Therapie mit Tamoxifen günstig reagieren (Bachmann, 1979; Kreuzer und Boquoi, 1970).

1.2 Methodik der Hormonrezeptorbestimmung

1.2.1 Übersicht

Im Jahre 1966 gelang es Toft und Gorski als erste das Östrogenrezeptorprotein aus dem Rattenuterus zu isolieren. Dabei verwendeten sie das Verfahren der Dichtegradientenzentrifugation. In der Folgezeit etablierten sich unterschiedliche Methoden zur Quantifizierung der Östrogenrezeptoren in vitro (Jungblut et al., 1972). Am häufigsten wurde die Methode mit dextranbeschichteter Aktivkohle benutzt (Korenman und Dukes, 1970), die sich mittlerweile zum Standardverfahren in der routinemäßigen Rezeptorbestimmung entwickelt hat. Alternative Methoden sind das Hydroxylapatitverfahren (Erdos et al., 1970) und die Saccharosedichtegradientenzentrifugation (Jensen et al., 1971). Methoden wie die Gelelektrophorese oder Gelfiltration (Codefrois und Brooks, 1970; Jungblut et al., 1972) konnten sich weniger durchsetzen. Das Verfahren der Dextrankohleadsorption soll im folgenden etwas näher geschildert werden, da es als Routinemethode bei unseren Untersuchungen zur Anwendung kam.

Einige prinzipielle Nachteile dieses Verfahrens rückten das Interesse an einfacheren und dennoch genaueren Methoden stärker in den Vordergrund. Die Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen das Östrogenrezeptorprotein ermöglicht es für die Zukunft einen neuen Routinetest bereitzustellen. Dabei kann die Rezeptoranalyse quantitativ am Tumorgewebe nach Art eines Enzymimmunoassays und qualitativ am Gefrierschnitt bzw. Abklatschpräparat unter Verwendung immunohistochemischer Methoden (Peroxidase-Sandwichtchnik) vorgenommen werden. Bei geringerer Menge an Untersuchungsmaterial sind mit der letztgenannten Methode auch Aussagen über multiklonale Tumoren zu treffen.

1.2.2 DCC-Assay

1.2.2.1 Handhabung der Gewebeproben

Die Aufbereitung des Untersuchungsmaterials ist für den DCC-Assay und den Enzymimmunoassay identisch. Auf Grund der Instabilität der Rezeptorproteine müssen die Proben unmittelbar nach Entfernung aus dem Organismus in flüssigem Stickstoff oder in Trockeneis tiefgefroren werden. Das grob vorzerkleinerte Tumormaterial wird in Trispuffer (10mM Tris-HCl pH 7,4; 1,5 mM EDTA; 5 mM Monothioglycerin) unter Eiskühlung mit dem Ultraturax oder mit Hilfe eines Mikrodismembrators homogenisiert. Zur Herstellung des Cytosols wird das Homogenat 30 Min. bei 120.000 g ultrazentrifugiert (Gardner und Wittliff, 1973). Das Cytosol findet sich am Ende des Verfahrens als Überstand. Bei unseren Untersuchungen wurde dieses Cytosol entweder direkt frisch oder nach Tiefgefrierung mit dem DCC-Assay bzw. Enzymimmunoassay (EIA) untersucht.

1.2.2.2 Inkubation des Cytosols

Aliquote des Cytosols werden mit steigenden Konzentrationen an 3H-Östradiol (E_2) (1 - 16 nM) allein und in Gegenwart eines 200-fachen Überschusses an Diäthylstilböstrol (DES) 15 Stunden bei 4⁰ C inkubiert. Die freien Bindungsstellen lassen sich dadurch absättigen. Der Überschuß an DES zur Bestimmung der unspezifischen Bindung verdrängt selektiv 3H - E_2 von der spezifischen Rezeptorbindung. Die Bestimmung der Progesteronrezeptoren geschieht nach dem gleichen Prinzip, wobei als radioaktiver Ligand 3H - R 5020 verwendet wird. Die Hemmung der spezifischen Re-

zeptorbindung erfolgt durch Zugabe eines 200-fachen unmarkierten Überschusses an R 5020.

1.2.2.3 Trennung des proteingebundenen vom freien Steroid

Die Trennung des freien vom gebundenen Steroid soll rasch vor sich gehen, um die Dissoziation des Steroidrezeptorkomplexes zu verhindern. Außerdem soll sie quantitativ sein. Hierzu hat sich die Adsorption des freien Steroids an dextranbeschichtete Aktivkohle (Korenman und Dukas, 1970) am besten bewährt. Dabei geht man so vor, daß nach der Inkubation des Cytosols die Dextranaktivkohlesuspension (0,5 % Aktivkohle; 0,05 % Dextran) in 10 mM Tris - HCl pH 7,4 dem Inkubationsmedium zugefügt wird. Nach zehn Min. Einwirkungszeit bei 4° C wird das Gesamtvolumen zentrifugiert. Die Radioaktivität eines Aliquots des Überstandes aus jedem Röhrchen wird gemessen und in einem Diagramm gegen die Menge an zugegebenem radioaktivem Steroid aufgetragen.

1.2.2.4 Bestimmung der Rezeptorquantität

Die eben erwähnte Darstellung im Diagramm ergibt für die einzelnen Meßpunkte die Kurven der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung. Durch ein mathematisches Interpolationsverfahren können diese Kurven auf der Basis des Massenwirkungsgesetzes exakter approximiert werden (Jawny et al., 1984). Die spezifische Bindung erhält man durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung. Die hierdurch ermittelten Meßwerte für die spezifische Bindung werden üblicherweise nach dem von Scatchard (1949) angegebenen Verfahren transformiert, wo-

bei die Werte des Quotienten "gebundenes / freies " markiertes Steroid gegen "gebundenes" Steroid aufgetragen werden. Dies ergibt eine Gerade, deren Schnittpunkt mit der Abszisse die totale Rezeptorkonzentration im Cytosol darstellt. Tumoren mit Rezeptorwerten, die kleiner als 10 fmol/mg cytosotisches Protein sind, gelten als rezeptor-negativ.

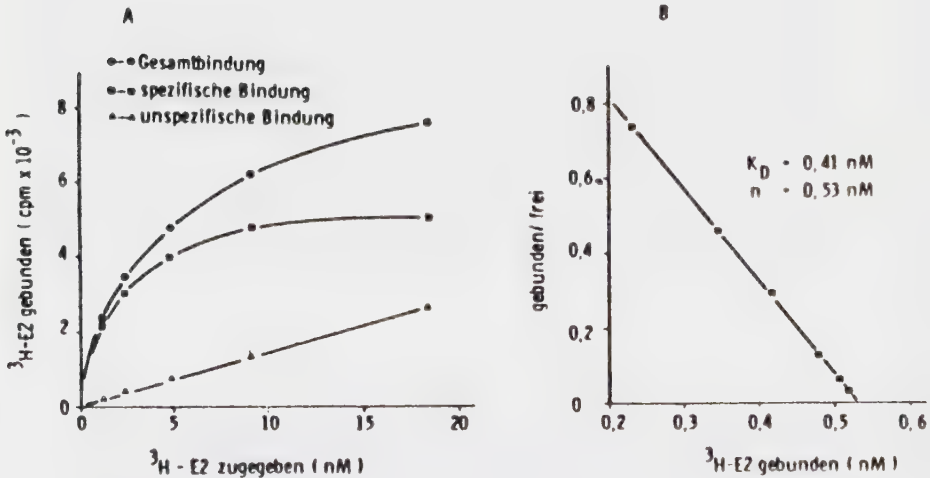


Abb. 1: A) Bindung von $^3\text{H-E}_2$ im DCC-Assay in Abhängigkeit von der Gesamtmenge des zugegebenen markierten Steroids.

B) Scatchard-Transformation der Meßwerte aus Abbildung A

1.2.2.5 Proteinbestimmung

Die Rezeptorwerte im Cytosol werden in fmol/mg Protein angegeben. Als Meßverfahren diente die von Lowry (1951) angegebene Methode. Dabei werden Aliquote des Cytosols und Standardlösungen aus Albumin und Globulin mit einer Testlösung als 1 % CuSO_4 , 2 % K-NA-Tartrat und 2 % Na_2CO_3 in 0,1 N Natronlauge und 1 N Folin & Ciocalteu's Reaktionslösung 30 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Extinktionen werden photometrisch bei 546 nm Wellenlänge gemessen. Als Leerwert dient der Homogenisationspuffer. Optimale Reaktionsbedingungen für den DCC-Assay und den Enzymimmunoassay liegen bei Proteinkonzentrationen zwischen 1 und 5 mg/ml.

1.2.3 Monoklonale Antikörper gegen das Östrogenrezeptorprotein

Die vergangene Praxis der routinemäßigen Rezeptorbestimmung hat gezeigt, daß das bisher am meisten verwendete Verfahren des DCC-Assays verschiedene Nachteile besitzt, die ausführlich diskutiert wurden (Koenders und Thorpe, 1983). Im wesentlichen hat sich Koenders von der EORTC-receptor group mit dem Problem der Standardisierung des DCC-Assays beschäftigt. Es ist bekannt, daß verschiedene Untersucher über erhebliche Unterschiede in den gemessenen Werten der Östrogenrezeptoren in lyophilisierten Cytosolen berichteten. Die Reproduzierbarkeit des DCC-Assays am gleichen Tumorcytosol innerhalb eines Labors schwankt ebenfalls erheblich (King, 1980; Wittliff et al., 1980; Raam et al., 1981; Jawny et al., 1985). Außerdem hat das Verfahren des DCC-Assays verschiedene prinzipielle Schwierigkeiten, die auf dem methodischen Ansatz beruhen. Zu nennen sind insbesondere Probleme in der Qualität der Aktivkohlepräparation, in der Qualität der tritiummarkierten Hormonpräparationen und in der Zähleffizienz. Auch das Problem der quantitativen Auswertung dieses Versuchs, insbesondere im Hinblick auf den Scatchard-Plot, wurde ausreichend erörtert (Wittliff et al., 1981; Kuss, 1982). Durch die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das Östrogenrezeptorprotein ist es in jüngster Zeit gelungen, das Verfahren der Rezeptorbestimmung auf eine neue methodische Basis zu stellen (Greene et al., 1980). Als erste Arbeitsgruppe berichtete Jensen aus dem Ludwig Institut for Cancer Research über Versuche, bei denen Lymphozyten von Ratten, die mit gereinigtem Östrogenrezeptorprotein aus dem Cytosol der MCF-7 Mammakarzinom-Zelllinie immunisiert worden waren, mit unterschiedlichen Zellstämmen von Myelomen aus Mäusen hybridisiert wurden. Hierbei gelang

es dreizehn Hybridomzelllinien zu erzeugen, die monoklonale Antikörper sezernieren, von denen jeder unterschiedliche antigene Determinanten des Rezeptormoleküls erkennt. Einige dieser monoklonalen Antikörper reagieren mit dem Östrogenrezeptor jeder möglichen Spezies, einige reagieren nur mit dem Rezeptor der Brustdrüse, aber nicht mit dem anderer Gewebe, und wiederum andere scheinen spezifisch für den Östrogenrezeptor für Primaten zu sein.

Bei Verwendung solcher spezifischer monoklonaler Antikörper ist neben einem enzymimmunochemischen Nachweis der Östrogenrezeptoren im Tumorcytosol auch eine immunocytochemische Färbung der Östrogenrezeptoren nach dem Peroxidaseverfahren an Gefrierschnitten menschlicher Mammakarzinome möglich, die in Äthanol oder in einem Pikrinsäure-Formaldehyd-Reagenz fixiert wurden. Hierbei läßt sich darstellen, daß die Mehrheit der nachzuweisenden Rezeptormoleküle, die nach der Homogenisation im üblichen Verfahren im Cytosol erscheinen, hauptsächlich innerhalb des Zellkerns der intakten Zelle nachzuweisen sind (King und Greene, 1984; Welshons et al., 1984). Diese immunocytochemische Technik erlaubt außerdem die Identifikation gemischter Populationen von Tumorzellen, die zum Teil rezeptorpositiv oder rezeptornegativ sind. Alle diese Arbeiten waren möglich, nachdem Köhler und Milstein (1975) die Grundlagen für die Erzeugung spezifischer monoklonaler Antikörper gelegt hatten.

Durch Vergleich des Rezeptornachweises mittels einer enzymimmunochemischen Methode im Tumorcytosol und einer immunocytochemischen Methode an Tumorabklatschpräparaten soll im folgenden gezeigt werden, ob die prinzipiell zu erwartende größere Genauigkeit dieser Methode dem herkömmlichen DCC-Verfahren überlegen ist.

1.2.3.1 Enzymimmunoassay

Die Herstellung des Tumorcytosols und die Proteinbestimmung erfolgen nach der unter 1.2.2.1 und 1.2.2.5 angegebenen Methode.

1.2.3.1.1 Inkubation des Cytosols

Bei dem von uns verwendeten Enzymimmunoassay (ER-EIA Fa. Abbott Diagn.) ist der monoklonale Rattenantikörper gegen Östrogenrezeptor auf Kugeln beschichtet, die mit den Gewebscytsolen inkubiert werden. Während dieser Inkubation von 18 Stunden bei $2 - 8^{\circ}\text{C}$ wird der Östrogenrezeptor an die Kugeln gebunden.

1.2.3.1.2 Trennung der Rezeptoren vom Cytosol

Am Ende der Inkubationszeit wird das Cytosol abgesaugt. Die Kugeln werden anschließend zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Dieser Arbeitsvorgang liefert die an die Kugeln gebundenen isolierten Östrogenrezeptoren. Dabei werden im Unterschied zur Inkubation mit radioaktiven Steroiden beim DCC-Assay sowohl freie als auch von endogenen Hormonen besetzte Rezeptoren adsorbiert, da die Antikörper-Rezeptor-Interaktion nicht mit der Hormonbindungsstelle, sondern mit anderen antigenen Determinanten des Rezeptormoleküls stattfindet.

1.2.3.1.3 Bestimmung der Rezeptorquantität

Als Voraussetzung für die spektralphotometrische Messung einer enzymatischen Reaktion werden die ER-Kugeln 60 Min. bei 37⁰ C im Wasserbad mit einem monoklonalen Rattenantikörper gegen Östrogenrezeptoren, der mit Peroxidase konjugiert ist, inkubiert. Dieser kombinierte Antikörper bindet an den auf der Kugeloberfläche bereits fixierten Östrogenrezeptor, wobei eine neue antigene Determinante des Rezeptorproteins erkannt wird. Am Ende dieser Inkubation wird durch einen weiteren Waschvorgang schließlich ungebundenes Antikörperkonjugat entfernt. Sodann wird als Starter der Enzymreaktion Wasserstoffperoxid und Orthophenylendiamin (OPD) zugefügt. Die Reaktion der Peroxidase mit H₂O₂ wandelt OPD in ein Reaktionsprodukt um, dessen Färbung ein Maß für die Menge an gebundenem ER-Konjugat darstellt. Diese Reaktion wird 30 Min. bei Raumtemperatur abgewartet und anschließend mit 1 N Schwefelsäure gestoppt. Die spektralphotometrisch zu messende Extinktion bei 492 nm Wellenlänge ist zur ER-Konzentration des Cytosols proportional. Vorgegebene Standardpräparationen mit bekanntem Östrogenrezeptorgehalt erlauben durch Vergleich der bei ihnen gemessenen Extinktionen mit den Meßwerten aus den untersuchten Tumorcytosolen den Rückschluß auf die Absolutwerte in der Tumorprobe. Auch bei dem Verfahren mit monoklonalen Antikörpern gelten Tumoren mit Rezeptorwerten kleiner als 10 fmol/mg cytosolisches Protein als negativ.

1.2.3.2 Immunocytochemischer Assay

Neben der oben beschriebenen Methode als Enzymimmunoassay im Tumorcytosol läßt sich dasselbe Prinzip auch an Tumorabklatschpräparaten durchführen. Die zu beschreibende immunocytochemische Technik (ER-ICA Fa. Abbott Diagn.) wurde bisher an gefrorenen Gewebsschnitten erprobt.

1.2.3.2.1 Vorbereitung der Gewebeproben

Die zu untersuchenden Objektträger werden zuerst mit Gewebekleber behandelt. Sodann wird das Tumorpräparat fest aufgedrückt, um die Haftung einer ausreichenden Menge an Tumorzellverbänden zu ermöglichen. Zur Fixation werden die Objektträger für 15 Min. bzw. zwei Std. in 3,7 %-iges Formaldehyd-PBS eingelegt (10 Vol.% Formaldehyd, 90 Vol.% PBS). Zur Herstellung der PBS-Lösung als 0,01 M Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit pH 7,4 werden NaCl, K_2HPO_4 und KH_2PO_4 verwendet. Nach der Fixation werden die Objektträger fünf Min. in ein PBS-Bad gegeben, danach drei bis fünf Min. in Methanol (-10 bis $-25^{\circ}C$), ein bis drei Min. in Aceton (-10 bis $-25^{\circ}C$) und schließlich zweimal für je sechs Min. in PBS bei Raumtemperatur.

1.2.3.2.2 Inkubation der Gewebeproben

Die Objektträger werden anschließend für 15 Min. in einer feuchten Kammer mit Ziegenserum in Phosphatpuffer inkubiert, um eine unspezifische Bindung der später verwendeten Antikörper zu verhindern. Nach Entfernung dieses Reagenz wird ein monoklonaler Rattenantikörper gegen humane Östrogenrezeptoren für 30 Min. in der feuchten Kammer hin-

zugegeben. Die Zugabe eines Kontrollantikörpers (normales Ratten-IgG) zu einem zweiten Objektträger hat den Sinn, später eine Beurteilung der unspezifischen Bindung der Reagenzien an die Probe zu ermöglichen. Es folgt ein zweimaliger Waschvorgang mit PBS. In einer weiteren Inkubationsphase von 30 Min. wird der brückenbildende Antikörper (Anti-Ratte-IgG-Ziege) zugegeben. Dieser bindet sowohl an den monoklonalen Antikörper gegen ER als auch an den Kontrollantikörper Ratte-IgG. Nach erneutem zweimaligem Waschvorgang mit PBS wird für 30 Min. ein Komplex aus IgG-Ratte-anti-Peroxidase/Peroxidase auf die Objektträger gegeben. Dieser wird an den brückenbildenden Antikörper anti-Ratte-IgG-Ziege gebunden. Diese Inkubationsphase wird durch zweimalige PBS-Waschung beendet (s. Abb. 2).

1.2.3.2.3 Bestimmung der Rezeptorquantität

Die Objektträger werden zur Auslösung der enzymatischen Farbreaktion für sechs Min. mit Wasserstoffperoxid und Diaminobenzidin inkubiert. Die Umwandlung des Wasserstoffperoxids durch die Peroxidase überführt Diaminobenzidin in ein unlösliches rötlich-braunes Farbprodukt. Anschließend werden die Objektträger fünf Min. mit destilliertem Wasser gespült und zur Darstellung aller Zellkerne mit 1-%igem Hämatoxylin für fünf Min. behandelt. Vor der lichtmikroskopischen Betrachtung werden die Objektträger wie herkömmliche mikroskopische Präparate in Äthanol und Xylol fixiert. Das Ausmaß des Rezeptornachweises kann grob quantifiziert werden durch eine Unterteilung in drei Intensitätsgrade der nachgewiesenen braunroten Färbung im Zellkern (+ bis +++). Durch Färbung der Kontrollschnitte wird diese grobe Quantifizierung erleichtert.

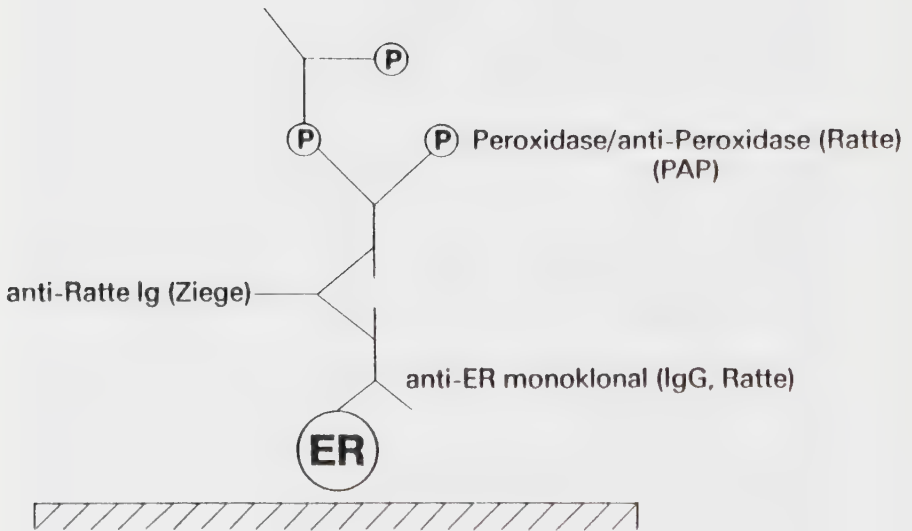


Abb. 2: Schema der Antikörperkomplexe beim immunocytochemischen Assay

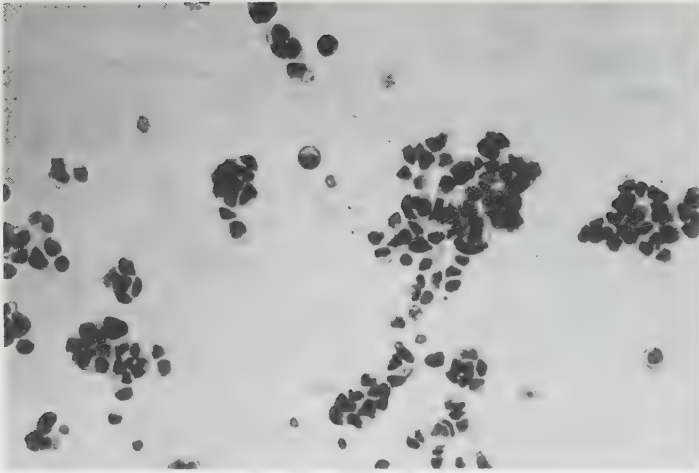


Abb. 3: Bereiche östrogenrezeptorpositiver Zellen
Vergrößerung 250-fach

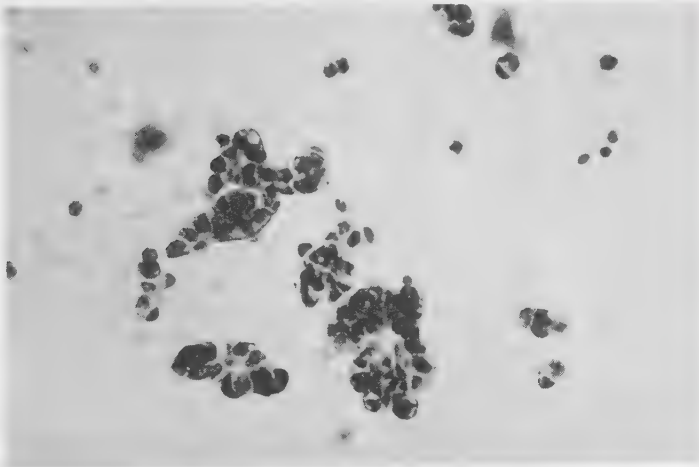


Abb. 4: negative Kontrolle (Beschichtung des Abklatsch-
präparates mit normalem Ratten-IgG an Stelle von
Anti-ER-human-Ratte monoklonal)
Vergrößerung 250-fach

2. ERGEBNISSE

2.1 Mammakarzinom

2.1.1 Tabelle 1: Meßwertvergleich Enzymimmunassay - DCC-Assay für die Östrogenrezeptorbestimmung bei frisch hergestellten Tumorcytosolen

n = 34

Enzymimmunoassay (fmol/mg Protein)	DCC-Assay (fmol/mg Protein)
873	1017
395	207
386	331
372	211
290	232
212	81
207	59
185	78
150	62
149	74
107	103
94	0
83	81
70	73
66	0
54	157
54	0
53	201
45	16
30	26
20	0
10	21

rezeptornegativ = <10 fmol/mg Protein
in EIA+DCC in 12 Fällen

2.1.2 Tabelle 2: Meßwertvergleich Enzymimmunoassay -
DCC-Assay für die Östrogenrezeptorbestimmung
bei tiefgefrorenen Tumorcytosolen

n = 17

Enzymimmunoassay (fmol/mg Protein)	DCC-Assay (fmol/mg Protein)
213	77
205	138
196	238
170	167
115	66
103	54
51	154
42	65
35	19
26	19
24	100
16	0

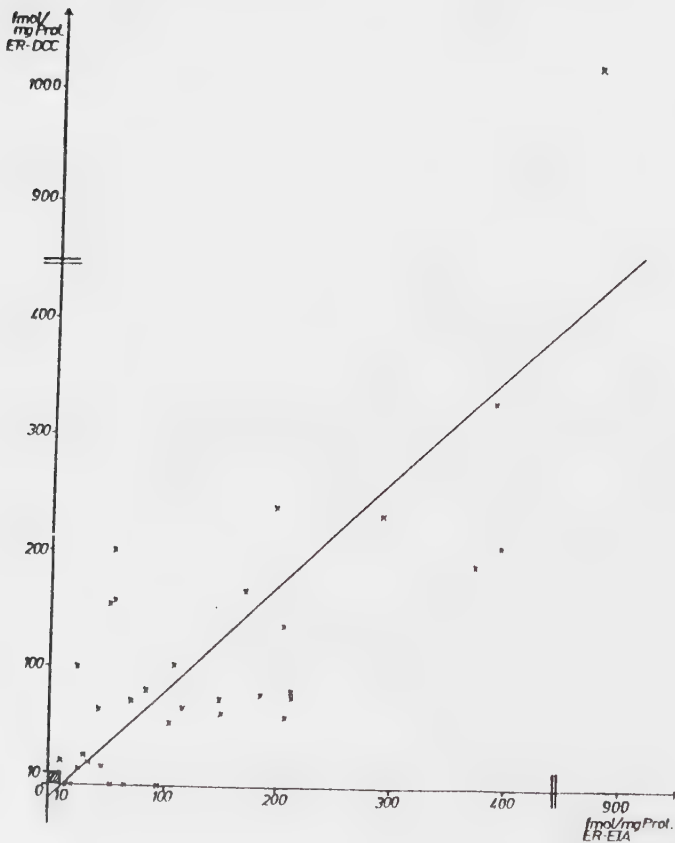
rezeptornegativ = <10 fmol/mg Protein
in EIA+DCC in 5 Fällen

2.1.3 Abbildung 5: Korrelation Enzymimmunassay -
DCC-Assay quantitativ für frische und tief-
gefrorene Tumorcytosole

n = 51

Steigung: m = 0,92

Korrelation: r = 0,9

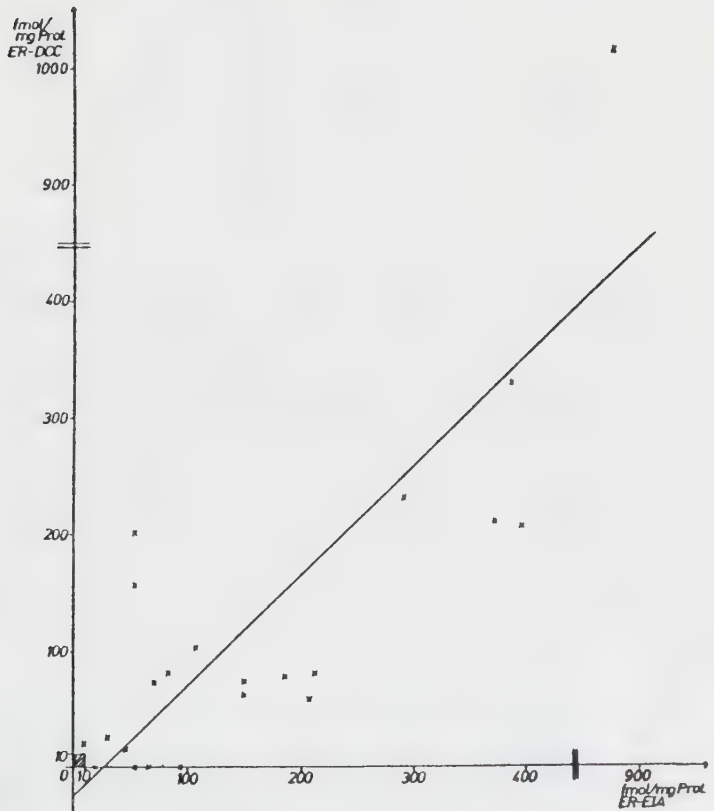


2.1.4 Abbildung 6: Korrelation Enzymimmunoassay -
DCC-Assay quantitativ für frische Tumorcytosole

n = 34

Steigung: m = 0,95

Korrelation: r = 0,92

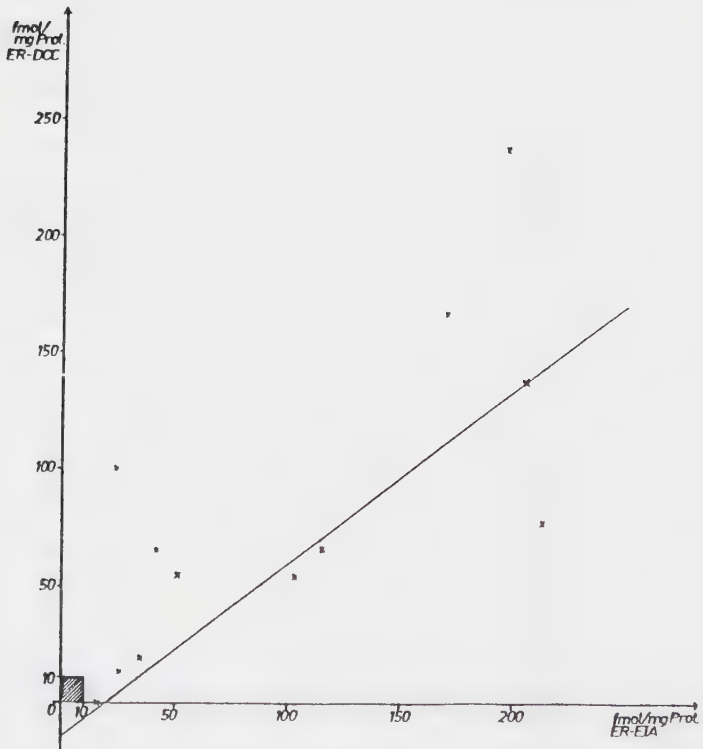


2.1.5 Abbildung 7: Korrelation Enzymimmunoassay -
DCC-Assay quantitativ für tiefgefrorene
Tumorcytosole

n = 17

Steigung: m = 0,69

Korrelation: r = 0,75



2.1.6 Tabelle 3: Korrelation Enzymimmunoassay - DCC-Assay
qualitativ für frische und tiefgefrorene
Tumorcytosole

n = 51

		EIA	
		-	+
DCC	-	17	5
	+	-	29

46 von 51 Tumorproben stimmen qualitativ überein, entsprechend einer Quote von 90 %. Von diesen 90 % sind 33 % mit beiden Assays östrogenrezeptornegativ (17 Fälle) und 77 % östrogenrezeptorpositiv (29 Fälle). In 5 Fällen (10 %) lassen sich mit dem Enzymimmunoassay Östrogenrezeptoren nachweisen, mit dem DCC-Assay ist jedoch kein Rezeptornachweis möglich. Die Kombination Enzymimmunoassay östrogenrezeptornegativ / DCC-Assay östrogenrezeptorpositiv kommt nicht vor.

Korrelation EIA-DCC aufgeschlüsselt nach Rezeptorgehalt:

n = 51

		EIA (fmol/mg Protein)			
		<10	10-50	51-100	>100
DCC (fmol/mg Protein)	<10	17	2	3	-
	10-50	-	5	-	-
	51-100	-	2	2	8
	>100	-	-	3	9

Es zeigt sich, daß bei den 29 Tumorproben, die mit beiden Verfahren östrogenrezeptorpositiv sind, der Rezeptorgehalt von Enzymimmunoassay und DCC-Assay keine großen Differenzen aufweist. In 8 Fällen beträgt der Rezeptorgehalt im Enzymimmunoassay mehr als 100 fmol/mg Protein, im DCC-Assay nur 51-100 fmol/mg Protein. Genau umgekehrt verhält es sich bei 3 Fällen (EIA: 51-100 fmol/mg Protein, DCC: >100 fmol/mg Protein). 9 aller 51 Tumorproben zeigen einen Rezeptorgehalt mit beiden Assays von über 100 fmol/mg Protein.

2.1.7 Tabelle 4: Meßwertvergleich für die Östrogenrezeptorbestimmung an frischen und tiefgefrorenen Tumorcytosolen im Enzymimmunoassay

n = 14

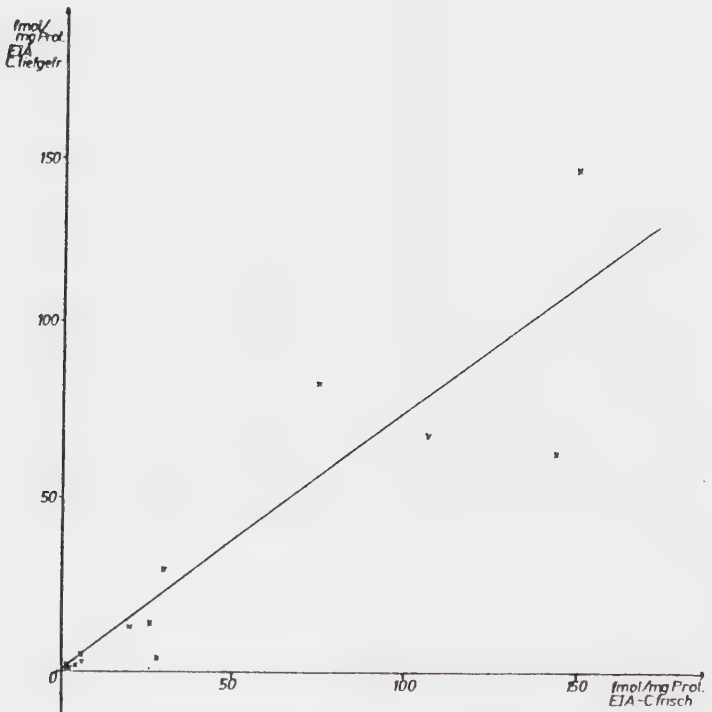
EIA:Cytosol (frisch hergestellt) (fmol/mg Protein)	EIA:Cytosol (tiefgefroren 3 Wo.) (fmol/mg Protein)
150	147
144	62
107	65
75	82
30	29
28	4
26	14
20	13
6	3
5	5
4	2
2	1
2	1
1	2
Mittelwert: 43	31

2.1.8 Abbildung 8: Korrelation frisches - tiefgefrorenes
Tumorcytosol quantitativ für den Enzymimmunoassay

n = 14

Steigung: m = 0,73

Korrelation: r = 0,90



2.1.9 Tabelle 5: Enzymimmunoassay bei ER-negativen und
PR-positiven (DCC-Assay) tiefgefrorenen
Tumorceytosolen

n = 10 prämenopausal

		EIA (fmol/mg Protein)		
		<10	10-20	>20
DCC (fmol/mg Protein)	<10	7	3	-

Bei den Tumorproben der prämenopausalen Patientinnen weisen 3 von 10 Fällen (30 %) mit dem Enzymimmunoassay einen niedrigen Östrogenrezeptorgehalt (10-20 fmol/mg Protein) auf.

n = 11 postmenopausal

		EIA (fmol/mg Protein)		
		<10	10-20	>20
DCC- (fmol/mg Protein)	<10	6	3	2

Bei den Tumorproben der postmenopausalen Patientinnen lassen sich mit dem Enzymimmunoassay in 5 von 11 Fällen

(45 %) zusätzliche Östrogenrezeptoren nachweisen. Von diesen 5 Fällen beträgt der Rezeptorgehalt bei 3 Tumorproben 10-20 fmol/mg Protein, bei 2 Tumorproben über 20 fmol/mg Protein.

n = 4 Menopausenstatus unklar

		EIA /fmol/mg Protein)		
		<10	10-20	>20
DCC (fmol/mg Protein)	<10	2	1	1
	>10	0	0	0

Bei den Tumorproben mit unklarem Menopausenstatus finden sich in der Hälfte der Fälle mit dem Enzymimmunoassay zusätzliche Östrogenrezeptoren, in einem Fall beträgt dabei der Östrogenrezeptorgehalt 10-20 fmol/mg Protein, bei der anderen Tumorprobe mehr als 20 fmol/mg Protein.

2.1.10 Beispiele für den Östrogenrezeptornachweis mit dem immunocytochemischen Assay

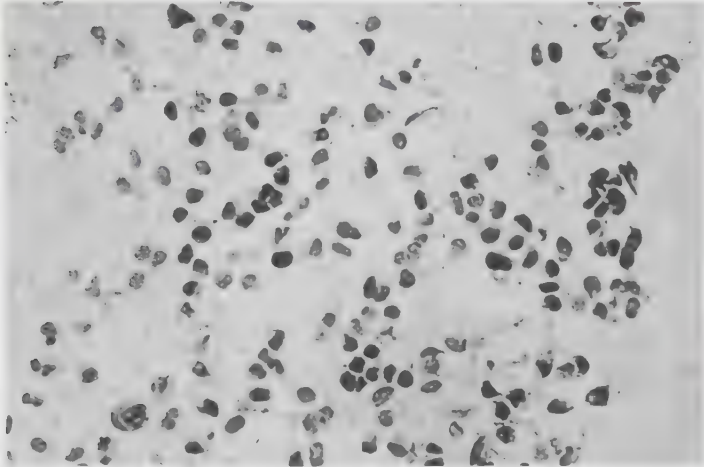


Abb. 8: EIA 873 fmol/mg DCC 1017 fmol/mg ERICA +++
Vergrößerung 250-fach

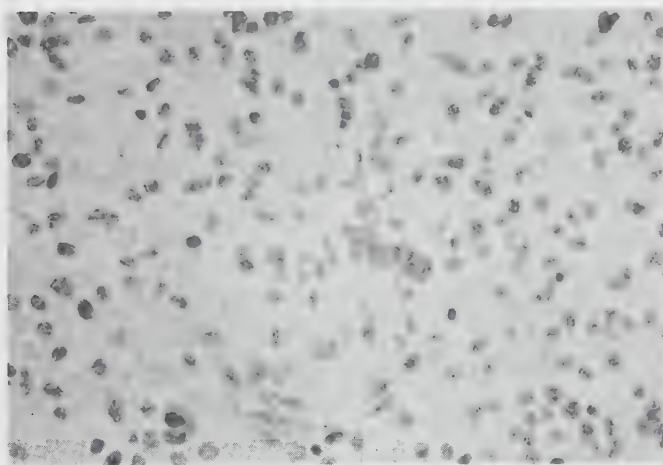


Abb. 9: EIA 395 fmol/mg DCC 207 fmol/mg ERICA negativ
Vergrößerung 400-fach

2.1.11 Tabelle 6: Korrelation Enzymimmunoassay -
immunocytochemischer Assay

n = 23

		EIA	
		-	+
ERICA	-	4	5
	+	-	14

18 von 23 Tumorproben stimmen qualitativ überein, entsprechend einer Quote von 78 %. Von diesen 78 % sind 22 % mit beiden Verfahren östrogenrezeptornegativ (4 Fälle) und 78 % östrogenrezeptorpositiv (14 Fälle). In 5 Fällen (22 %) lassen sich mit dem Enzymimmunoassay Östrogenrezeptoren nachweisen, mit dem immunocytochemischen Assay ist jedoch kein Rezeptornachweis möglich. Die Kombination Enzymimmunoassay östrogenrezeptornegativ / immunocytochemischer Assay östrogenrezeptorpositiv kommt nicht vor.

2.1.12 Tabelle 7: Korrelation DCC-Assay - immunocyto-
chemischer Assay

n = 23

		DCC	
		-	+
ERICA	-	15	4
	+	3	11

16 von 23 Tumorproben stimmen qualitativ überein, entsprechend einer Quote von 70 %. Von diesen 70 % sind 31 % mit beiden Verfahren östrogenrezeptornegativ (5 Fälle) und 69 % östrogenrezeptorpositiv (11 Fälle). In 4 Fällen (17 %) lassen sich mit dem DCC-Assay Östrogenrezeptoren nachweisen, mit dem immunocytochemischen Assay ist kein Rezeptornachweis möglich. 3 Fälle (13 %) sind mit dem DCC-Assay östrogenrezeptornegativ, mit dem immunocytochemischen Assay jedoch östrogenrezeptorpositiv.

2.2 Ovarialkarzinom

2.2.1 Tabelle 8: Steroidrezeptorverteilung (ER, PR) im
DCC-Assay

n = 44

	n	mittl. Rezeptorgehalt (fmol/mg Protein)	
		ER	PR
ER +	20	35 Streuung (16-83)	
PR +	17		40 Streuung (10-191)
ER + / PR +	9	32	53
ER + / PR -	11	38	
ER - / PR +	8		25
ER - / PR -	16		

In 20 von 44 Tumorproben (46 %) lassen sich Östrogenrezeptoren (ER) und in 17 von 44 Tumorproben (39 %) Progesteronrezeptoren (PR) nachweisen. Der mittlere Rezeptorgehalt liegt bei den Progesteronrezeptoren etwas höher (40 fmol/mg Protein) als bei den Östrogenrezeptoren (35 fmol/mg Protein). Auch die Streuung der Rezeptorwerte ist bei den Progesteronrezeptoren größer (10-191 fmol/mg Protein) als bei den Östrogenrezeptoren (16-83 fmol/mg Protein).

Der gleichzeitige Nachweis von Östrogen- und Progesteronrezeptoren ist in 9 Fällen (21 %) möglich, auch hier liegt der mittlere Progesteronrezeptorgehalt mit 53 fmol/mg Protein höher als der der Östrogenrezeptoren mit 32 fmol/mg Protein. Bei 16 Tumorproben (36 %) sind weder Östrogen- noch Progesteronrezeptoren vorhanden. Die Kombination östrogenrezeptorpositiv und progesteronrezeptornegativ tritt in 11 Fällen (25 %) mit einem mittleren Östrogenrezeptorgehalt von 38 fmol/mg Protein auf, die Kombination östrogenrezeptornegativ und progesteronrezeptorpositiv in 8 Fällen (18 %) mit einem mittleren Progesteronrezeptorgehalt von 25 fmol/mg Protein.

2.2.2 Tabelle 9: Steroidrezeptorverteilung (ER, PR) und histologischer Typ

n = 44

	n	ER+	PR+	ER+ PR+	ER+ PR-	ER- PR+	ER- PR-
serös	24	11	9	6	5	3	10
muzinös	5	2	3	1	1	2	1
endometrioid	10	6	4	2	4	2	2
entdiffe- renziert	5	1	1	-	1	1	3

Es können in allen histologischen Untergruppen Östrogen- und Progesteronrezeptoren in unterschiedlicher Häufigkeit nachgewiesen werden.

Die meisten Karzinome können als serös oder endometrioid klassifiziert werden. 11 der 24 serösen Karzinome sind östrogenrezeptorpositiv (46 %) und 9 progesteronrezeptorpositiv (38 %). Bei den endometrioiden Karzinomen sind in 6 von 10 Fällen (60 %) Östrogenrezeptoren und in 4 von 10 Fällen (40 %) Progesteronrezeptoren vorhanden. Die muzinösen Karzinome zeigen in 40 % Östrogen- (2 von 5 Fällen) und in 60 % Progesteronrezeptoren (3 von 5 Fällen). Bei den undifferenzierten Karzinomen finden sich nur in 20 % Östrogen- oder Progesteronrezeptoren (jeweils 1 von 5 Fällen). Die Kombinationen beider Rezeptortypen finden sich regelhaft bei den verschiedenen histologischen Typen. Lediglich die Kombination ER-/PR- kommt bei serösen Karzinomen mit 10 von 24 Fällen (42 %) und bei undifferenzierten Karzinomen mit 3 von 5 Fällen (60 %) häufiger vor als bei muzinösen (1 von 5 Fällen $\hat{=}$ 20 %) und endometrioiden Karzinomen (2 von 10 Fällen $\hat{=}$ 20 %).

2.2.3 Tabelle 10: Steroidrezepterverteilung (ER, PR)
und Differenzierungsgrad

n = 44

	n	ER+	PR+	ER+ PR+	ER+ PR-	ER- PR+	ER- PR-
G I	12	5	4	1	4	3	4
G II	7	5	3	3	2	-	2
G III	25	10	10	5	5	5	10

Es lassen sich in Ovarialkarzinomen aller drei Differenzierungsgrade sowohl Östrogen- als auch Progesteronrezeptoren nachweisen. In der mit 25 von 44 Fällen größten Gruppe der undifferenzierten Karzinome finden sich in 10 Tumorproben (40 %) Östrogen- und in 10 Tumorproben (40 %) Progesteronrezeptoren. Bei den Karzinomen mit Differenzierungsgrad G II liegen die Zahlen prozentual noch höher: 5 von 7 Fällen sind östrogenrezeptorpositiv (71 %) und 3 von 7 progesteronrezeptorpositiv (43 %). Die Karzinome mit hohem Differenzierungsgrad zeigen in 5 von 12 Fällen (42 %) Östrogenrezeptoren und in 4 von 12 Fällen (33 %) Progesteronrezeptoren.

Die Kombinationen beider Rezeptortypen lassen sich in allen drei Differenzierungsgraden in ähnlicher Häufigkeit nachweisen. Lediglich die Kombination ER+/PR+ findet sich bei hochdifferenzierten Karzinomen nur in 1 von 12 Fällen (8 %), bei undifferenzierten in 5 von 25 Fällen (20 %). Beide Rezeptoren sind bei Karzinomen mit Grad I in 4 von

12 Fällen (33 %), mit Grad II in 2 von 7 Fällen (29 %) und mit Grad III in 10 von 25 Fällen (40 %) negativ.

2.2.4 Tabelle 11: Meßwertvergleich Enzymimmunoassay -
DCC-Assay für die Östrogenrezeptorbestimmung bei
frisch hergestellten Tumorzytosolen

n = 23

Enzymimmunoassay (fmol/mg Protein)	DCC-Assay (fmol/mg Protein)
95	119
77	0
72	90
60	28
40	25
30	21
28	0
23	0
22	37
14	0
1	10

rezeptornegativ = <10 fmol/mg Protein
in EIA+DCC in 12 Fällen

2.2.5 Tabelle 12: Meßwertvergleich Enzymimmunoassay-
DCC-Assay für die Östrogenrezeptorbestimmung bei
tiefgefrorenen Tumorcytosolen

n = 16

Enzymimmunoassay (fmol/mg Protein)	DCC-Assay (fmol/mg Protein)
75	16
31	21
30	63
21	24
19	83
4	27
1	21
1	16

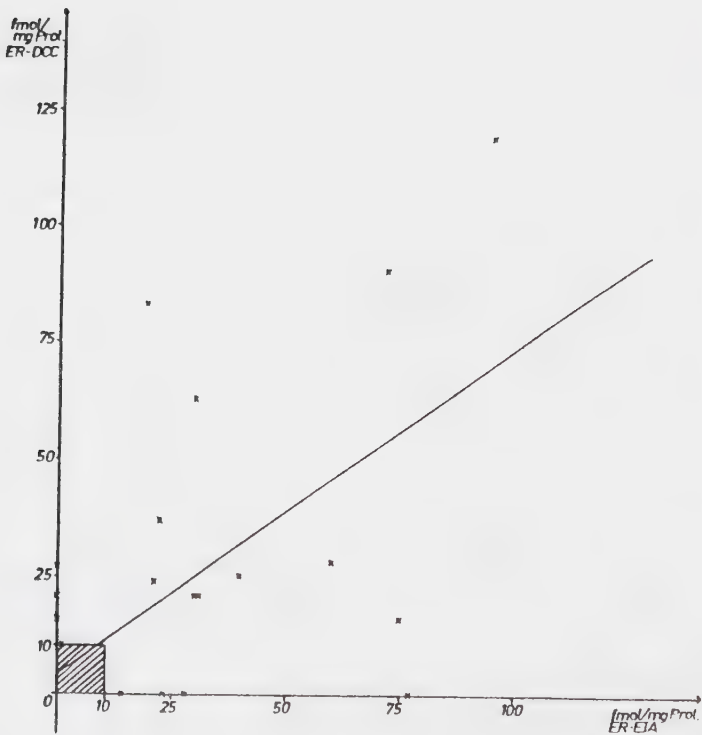
rezeptornegativ = <10 fmol/mg Protein
in EIA+DCC in 8 Fällen

2.2.6 Abbildung 10: Korrelation Enzymimmunoassay -
DCC-Assay quantitativ für frische und tiefge-
frorene Tumorcytosole

n = 39

Steigung: m = 0,69

Korrelation: r = 0,64

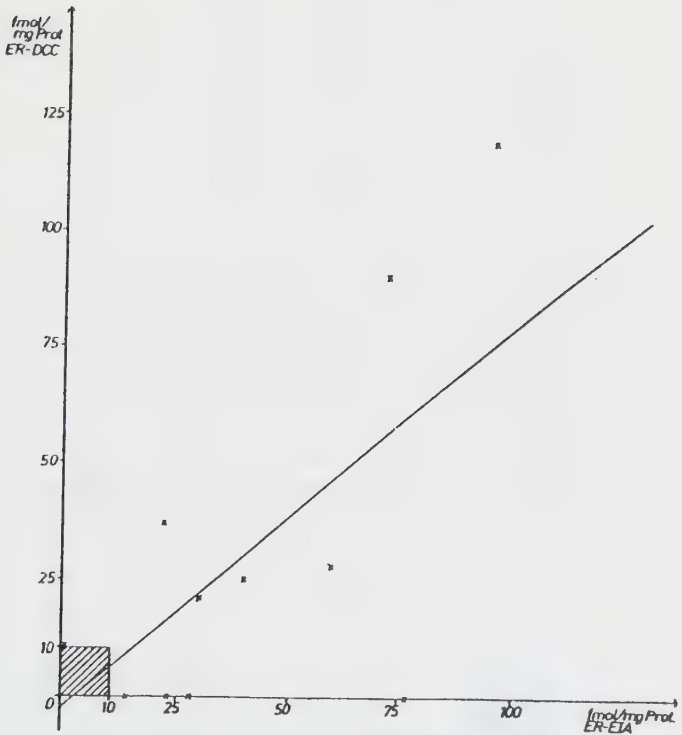


2.2.7 Abbildung 11: Korrelation Enzymimmunoassay -
DCC-Assay quantitativ für frische Tumorzytosole

n = 23

Steigung: m = 0,81

Korrelation: r = 0,77

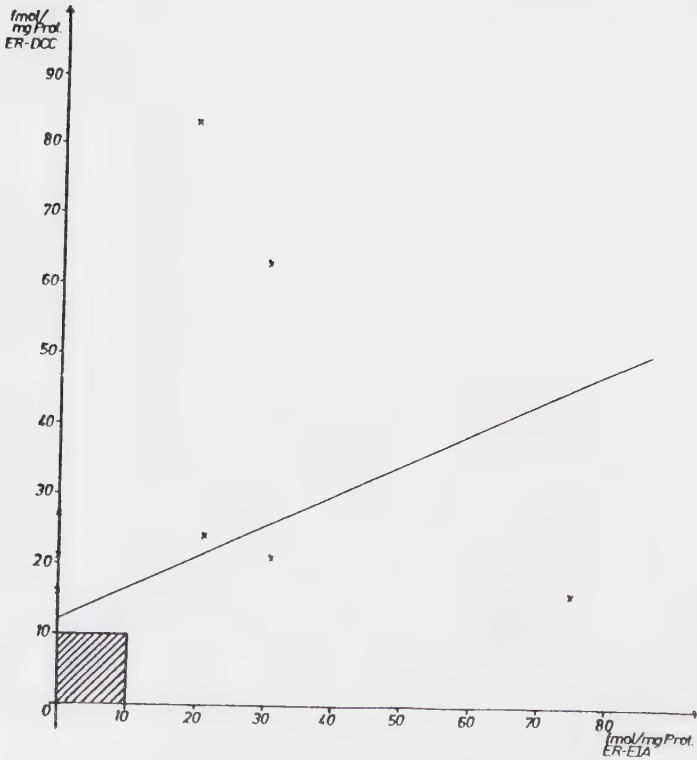


2.2.8 Abbildung 12: Korrelation Enzymimmunoassay -
DCC-Assay quantitativ für tiefgefrorene
Tumorcytosole

n = 16

Steigung: m = 0,45

Korrelation: r = 0,37



2.2.9 Tabelle 13: Korrelation Enzymimmunoassay -
DCC-Assay qualitativ für frische und tiefge-
frorene Tumorcytosole

n = 39

		EIA	
		-	+
DCC	-	20	4
	+	4	11

31 von 39 Tumorproben stimmen qualitativ überein, entsprechend einer Quote von 80 %. Von diesen 80 % sind 65 % mit beiden Assays östrogenrezeptornegativ (20 Fälle) und 35 % östrogenrezeptorpositiv (11 Fälle). In 4 Fällen (10 %) lassen sich mit dem Enzymimmunoassay Östrogenrezeptoren nachweisen, mit dem DCC-Assay ist kein Rezeptornachweis möglich. 4 Fälle (10 %) sind im DCC-Assay östrogenrezeptorpositiv, im Enzymimmunoassay jedoch östrogenrezeptornegativ.

Korrelation EIA-DCC aufgeschlüsselt nach Rezeptorgehalt:

n = 39

		EIA (fmol/mg Protein)			
		<10	10-50	51-100	>100
DCC (fmol/mg Protein)	<10	20	3	1	-
	10-50	4	5	2	-
	51-100	-	2	1	-
	>100	-	-	1	-

Die 11 Tumorproben, die mit beiden Verfahren Östrogenrezeptorpositiv sind, zeigen hinsichtlich des Rezeptorgehalts nur geringe Differenzen. Auch bei den 8 Fällen, die mit beiden Verfahren qualitativ nicht übereinstimmen (EIA-/DCC+ oder EIA+/DCC-), findet sich nur in einem Fall ein hoher Östrogenrezeptorgehalt (EIA: 51-100 fmol/mg Protein, DCC negativ), die anderen 7 Tumorproben weisen einen Rezeptorgehalt zwischen 10 und 50 fmol/mg Protein auf. Von allen 39 Tumorproben findet sich nur in einem Fall ein Rezeptorgehalt von mehr als 100 fmol/mg Protein (DCC-Assay).

2.2.10 Tabelle 14: Meßwertvergleich für die Östrogen-
rezeptorbestimmung an frischen und tiefgefrorenen
Tumorzytosolen im Enzymimmunoassay

n = 11

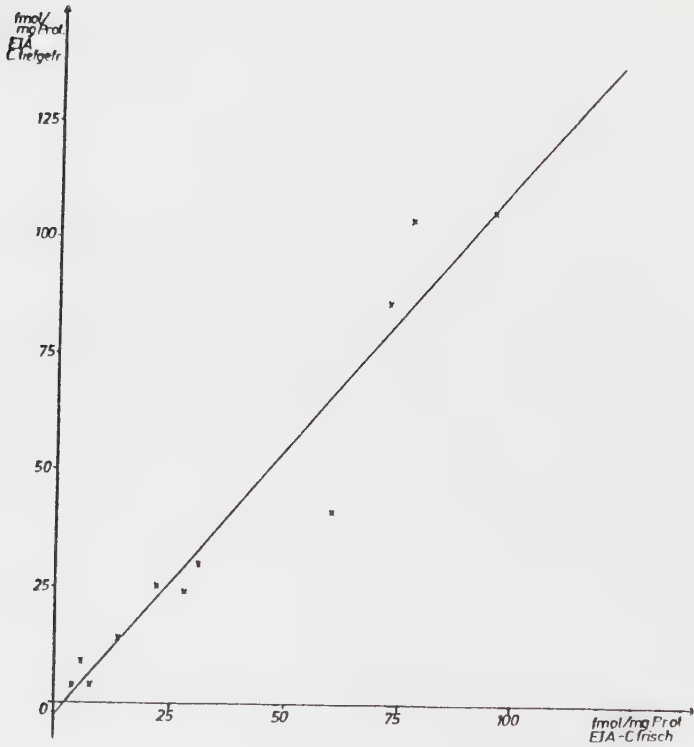
EIA:Cytosol (frisch hergestellt) (fmol/mg Protein)	EIA:Cytosol (tiefgefroren 3 Wo.) (fmol/mg Protein)
95	106
77	104
72	86
60	41
31	30
28	24
22	25
14	14
8	4
6	9
4	4
Mittelwert: 38	41

2.2.11 Abbildung 13: Korrelation frisches - tiefgefrorenes Tumorcytosol quantitativ für den Enzymimmunoassay

$n = 11$

Steigung: $m = 1,15$

Korrelation: $r = 0,97$



2.2.12 Beispiele für den Östrogenrezeptornachweis mit
dem immunocytochemischen Assay

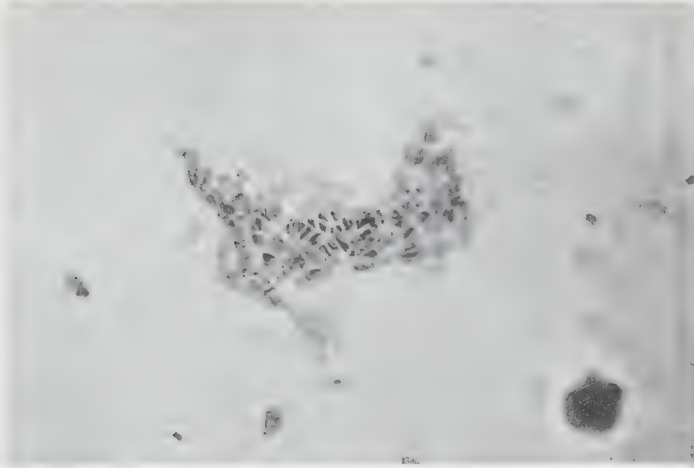


Abb. 14: EIA 23 fmol/mg DCC negativ ERICA ++
histologischer Typ: serös, G III
Vergrößerung 250-fach

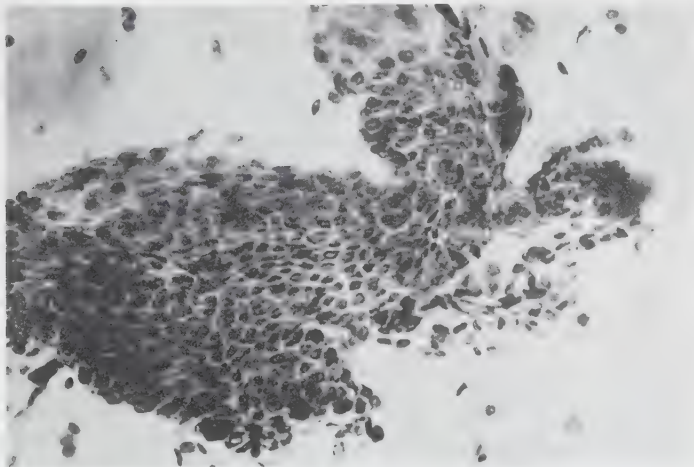


Abb. 15: EIA 14 fmol/mg DCC negativ ERICA negativ
histologischer Typ: serös, G I
Vergrößerung 250-fach

2.2.13 Tabelle 15: Korrelation Enzymimmunoassay - immunocytochemischer Assay

n = 13

		EIA	
		-	+
ERICA	-	5	6
	+	-	2

7 von 13 Tumorproben stimmen qualitativ überein, entsprechend einer Quote von 54 %. Von diesen 54 % sind 71 % mit beiden Verfahren östrogenrezeptornegativ (5 Fälle) und 29 % östrogenrezeptorpositiv (2 Fälle). In 6 Fällen (46 %) lassen sich mit dem Enzymimmunoassay Östrogenrezeptoren nachweisen, mit dem immunocytochemischen Assay ist jedoch kein Rezeptornachweis möglich. Die Kombination Enzymimmunoassay östrogenrezeptornegativ / immunocytochemischer Assay östrogenrezeptorpositiv kommt nicht vor.

2.2.14 Tabelle 16: Korrelation DCC-Assay - immunocyto-
chemischer Assay

n = 13

		DCC	
		-	+
ERICA	-	7	4
	+	1	1

8 von 13 Tumorproben stimmen qualitativ überein, entsprechend einer Quote von 62 %. Von diesen 62 % sind 88 % mit beiden Verfahren östrogenrezeptornegativ (7 Fälle) und 29 % östrogenrezeptorpositiv (1 Fall). In 4 Fällen (31 %) lassen sich mit dem DCC-Assay Östrogenrezeptoren nachweisen, mit dem immunocytochemischen Assay ist kein Rezeptornachweis möglich. Eine Tumorprobe ist im DCC-Assay östrogenrezeptornegativ, im immunocytochemischen Assay jedoch östrogenrezeptorpositiv.

2.3 Korpuskarzinom

2.3.1 Tabelle 17: Meßwertvergleich Enzymimmunoassay - DCC-Assay für die Östrogen- und Progesteronrezeptorbestimmung und Differenzierungsgrad

n = 6

ER-Enzym- immunoassay (fmol/mg Protein)	ER-DCC-Assay (fmol/mg Protein)	PR-DCC-Assay (fmol/mg Protein)	Differen- zierungsgrad
258	109	0	G III
237	231	0	G I
116	52	155	G II
45	0	0	G I
7	0	0	G III
2	0	460	G I

5 der 6 untersuchten Tumorproben zeigen mit Enzymimmunoassay und DCC-Assay qualitativ übereinstimmende Ergebnisse, davon sind 3 Fälle mit beiden Verfahren östrogenrezeptorpositiv und 2 Fälle östrogenrezeptornegativ.

Insgesamt lassen sich in 4 der 6 untersuchten Tumorproben mit dem Enzymimmunoassay Östrogenrezeptoren nachweisen, mit dem DCC-Assay in 3 der 6 Tumorproben. Progesteronrezeptoren finden sich mit dem DCC-Assay in 2 von 6 Fällen. Der Östrogenrezeptornachweis gelingt bei Karzinomen aller drei Differenzierungsgrade, Progesteronrezeptoren finden sich jedoch nicht bei entdifferenzierten Karzinomen.

2.3.2 Beispiele für den Östrogenrezeptornachweis mit dem immunocytochemischen Assay

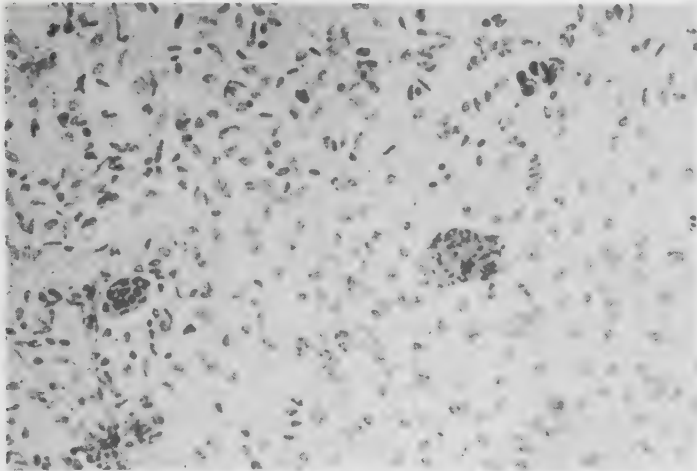


Abb. 16: EIA 237 fmol/mg DCC 231 fmol/mg ERICA ++
Differenzierungsgrad: G I
Vergrößerung 250-fach

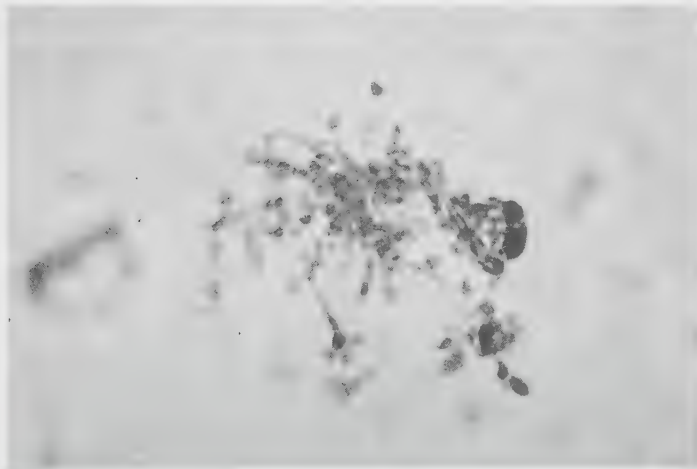


Abb. 17: EIA negativ DCC negativ ERICA negativ
Differenzierungsgrad: G I
Vergrößerung 400-fach

2.3.3 Tabelle 19: Korrelation Enzymimmunoassay -
immunocytochemischer Assay

n = 5

		EIA	
		-	+
ERICA	-	1	-
	+	-	4

Alle 5 Tumorproben stimmen qualitativ überein, 4 der 5 Fälle sind mit beiden Assays östrogenrezeptorpositiv, in 1 Fall sind beide Verfahren östrogenrezeptornegativ.

2.3.4 Tabelle 20: Korrelation DCC-Assay - immunocyto-
chemischer Assay

n = 5

		DCC	
		-	+
ERICA	-	1	-
	+	1	3

4 von 5 Tumorproben stimmen qualitativ überein (80 %), von diesen 4 Fällen sind 3 mit beiden Assays östrogenrezeptorpositiv, 1 Fall ist mit beiden Verfahren östrogenrezeptornegativ. In 1 Fall lassen sich mit dem immunocytochemischen Verfahren Östrogenrezeptoren nachweisen, mit dem DCC-Assay ist kein Rezeptornachweis möglich.

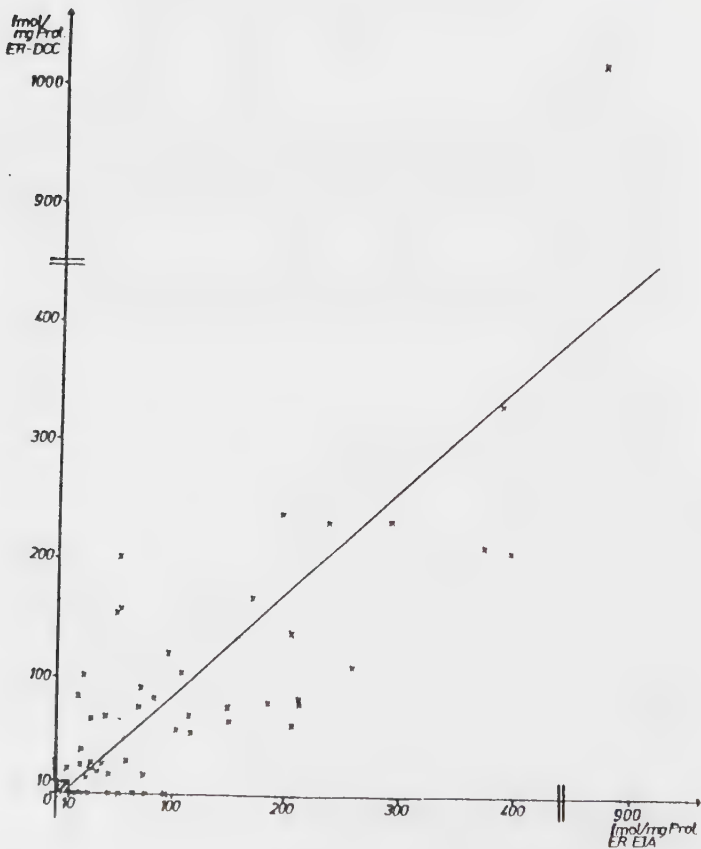
2.4 Gesamtvergleich für alle untersuchten Tumoren

2.4.1 Abbildung 18: Korrelation Enzymimmunoassay - DCC-Assay quantitativ für frische und tiefgefrorene Tumorcytosole

n = 96

Steigung: m = 0,89

Korrelation: r = 0,90

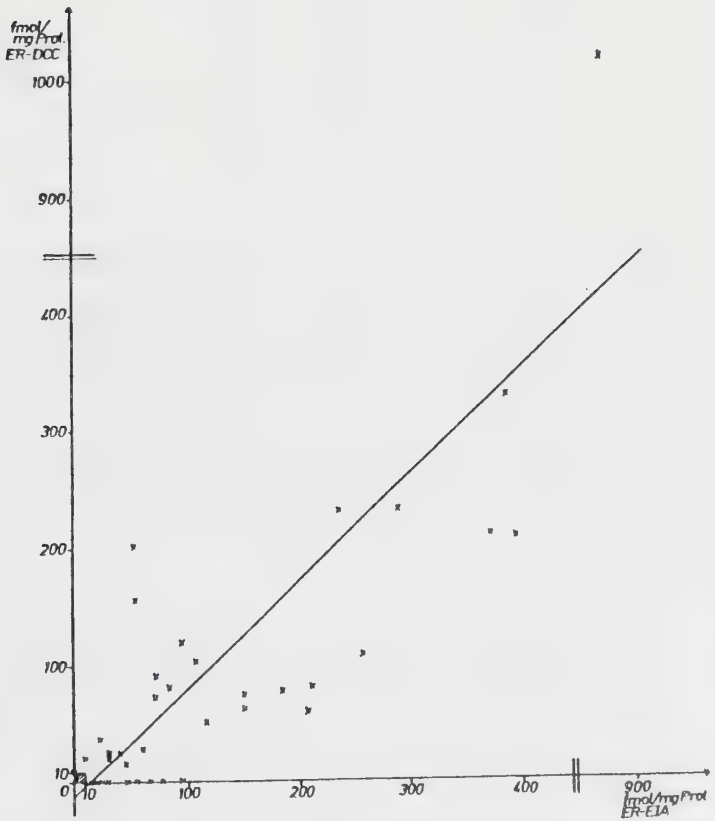


2.4.2 Abbildung 19: Korrelation Enzymimmunoassay -
DCC-Assay quantitativ für frische Tumorcytosole

n = 62

Steigung: m = 0,92

Korrelation: r = 0,92

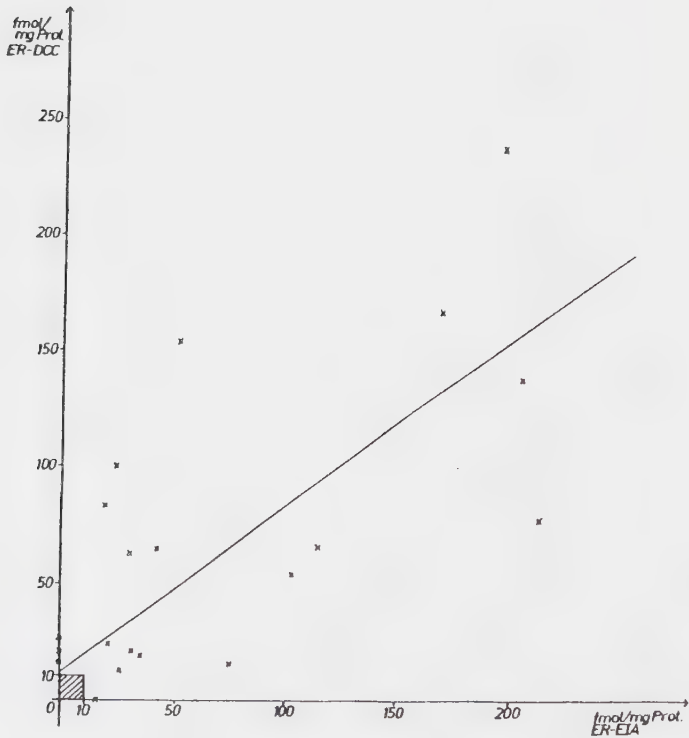


2.4.3 Abbildung 20: Korrelation Enzymimmunoassay -
DCC-Assay quantitativ für tiefgefrorene
Tumorcytosole

n = 34

Steigung: m = 0,71

Korrelation: r = 0,78



2.4.4 Tabelle 21: Korrelation Enzymimmunoassay -
DCC-Assay qualitativ für frische und
tiefgefrorene Tumorcytosole

n = 96

		EIA	
		-	+
DCC	-	39	10
	+	4	43

82 von 96 Tumorproben stimmen qualitativ überein, entsprechend einer Quote von 85 %. Von diesen 85 % sind 41 % mit beiden Assays Östrogenrezeptornegativ (39 Fälle) und 49 % Östrogenrezeptorpositiv (43 Fälle). In 10 Fällen (10 %) lassen sich mit dem Enzymimmunoassay Östrogenrezeptoren nachweisen, mit dem DCC-Assay ist kein Rezeptornachweis möglich. 4 Fälle (4 %) sind mit dem DCC-Assay Östrogenrezeptorpositiv, mit dem Enzymimmunoassay jedoch Östrogenrezeptornegativ.

Korrelation EIA-DCC aufgeschlüsselt nach Rezeptorgehalt:

n = 96

		EIA (fmol/mg Protein)			
		<10	10-50	51-100	>100
DCC (fmol/mg Protein)	<10	39	6	4	-
	10-50	4	10	2	-
	51-100	-	4	3	9
	>100	-	-	4	11

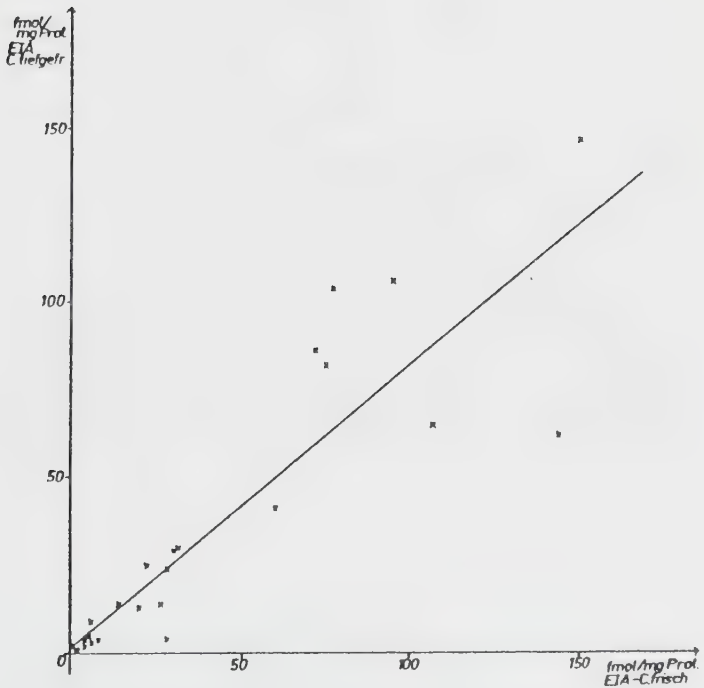
Bei den 43 Tumorproben, die mit beiden Verfahren östrogen-rezeptorpositiv sind, weist der Rezeptorgehalt keine großen Differenzen auf. In 9 Fällen beträgt der Rezeptorgehalt im Enzymimmunoassay mehr als 100 fmol/mg Protein, im DCC-Assay nur 51-100 fmol/mg Protein. Genau umgekehrt verhält es sich bei 4 Fällen (EIA: 51-100 fmol/mg Protein, DCC: >100 fmol/mg Protein). Auch bei den 14 Fällen, die mit beiden Verfahren qualitativ nicht übereinstimmen (EIA-/DCC+ oder EIA+/DCC-) findet sich nur in 4 Fällen ein höherer Östrogenrezeptorgehalt (EIA: 51-100 fmol/mg Protein, DCC negativ), die anderen 10 Tumorproben weisen einen Rezeptorgehalt zwischen 10 und 50 fmol/mg Protein auf. 11 aller 96 Tumorproben zeigen einen Rezeptorgehalt mit beiden Assays von über 100 fmol/mg Protein.

2.4.5 Abbildung 21: Korrelation frisches - tiefgefrorenes
Tumorcytosol quantitativ für den Enzymimmunoassay

n = 25

Steigung: m = 0,82

Korrelation: r = 0,89



2.4.6 Tabelle 22: Korrelation Enzymimmunoassay -
immunocytochemischer Assay

n = 41

		EIA	
		-	+
ERICA	-	10	11
	+	-	20

30 von 41 Tumorproben stimmen qualitativ überein, entsprechend einer Quote von 73 %. Von diesen 73 % sind 67 % mit beiden Verfahren Östrogenrezeptorpositiv (20 Fälle) und 33 % Östrogenrezeptornegativ (10 Fälle). In 11 Fällen (27 %) lassen sich mit dem Enzymimmunoassay Östrogenrezeptoren nachweisen, mit dem immunocytochemischen Assay ist jedoch kein Rezeptornachweis möglich. Die Kombination Enzymimmunoassay östrogenrezeptornegativ / immunocytochemischer Assay östrogenrezeptorpositiv kommt nicht vor.

2.4.7 Tabelle 23: Korrelation DCC-Assay - immunocyto-
chemischer Assay

n = 41

		DCC	
		-	+
ERICA	-	13	8
	+	5	15

28 von 41 Tumorproben stimmen qualitativ überein, entsprechend einer Quote von 68 %. Von diesen 68 % sind 54 % mit beiden Verfahren östrogenrezeptorpositiv (15 Fälle) und 46 % östrogenrezeptornegativ (13 Fälle). In 8 Fällen (20 %) lassen sich mit dem DCC-Assay Östrogenrezeptoren nachweisen, mit dem immunocytochemischen Assay ist kein Rezeptornachweis möglich. 5 Fälle (12 %) sind mit dem DCC-Assay östrogenrezeptornegativ, mit dem immunocytochemischen Assay jedoch östrogenrezeptorpositiv.

3. DISKUSSION

3.1 Mammakarzinom

3.1.1 Vergleich Enzymimmunoassay und DCC-Assay

Über die Verteilung von Östrogen- und Progesteronrezeptorwerten in Mammakarzinomen ist ausreichend berichtet worden (Eiermann und Jawny, 1982). Durch die Einführung der Assays mit monoklonalen Antikörpern soll es möglich sein, die unter 1.2.3 erwähnten prinzipiellen Nachteile des oben erwähnten DCC-Assays zu umgehen.

Der erste Teil unserer Untersuchungen beschäftigt sich deshalb mit einem Vergleich zwischen dem Enzymimmunoassay und dem herkömmlichen Dextrankohleadsorptionsverfahren. Dabei haben wir an einer Gesamtzahl von 51 Mammakarzinomen simultan die Bestimmung des Östrogenrezeptors mit beiden Verfahren durchgeführt. In dieser Zahl sind alle untersuchten Tumorcytosole zusammengefaßt, wobei einige davon zwischen der Homogenisation und der endgültigen Bestimmung tiefgefroren waren. Rezeptornegativ sind alle Werte kleiner als 10 fmol/mg cytosolisches Protein. Wie die Ergebnisse zeigen, ergibt sich bei dem quantitativen Vergleich beider Methoden eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9. Die Steigung der zu den Rezeptorwerten erstellten Graphik beträgt 0,92. Daraus ist ersichtlich, daß die mit dem Enzymimmunoassay gemessenen mittleren Rezeptorwerte ziemlich genau denen des DCC-Assays entsprechen, die Methode also weder grob unter- noch überschätzt. Der zur Zeit verfügbare Test (EIA) soll nach den Angaben des Herstellers (Fa. ABBOTT) lediglich an frisch hergestelltem Tumorcytosol durchgeführt werden. Nur für diese Untergruppe ergibt

sich bei einem Vergleich zwischen dem Enzymimmunoassay und dem Dextrankohleverfahren bei der Fallzahl von 34 Proben ein Korrelationskoeffizient von 0,92. Die Steigung der dazugehörigen Gerade zeigt sogar einen Wert von 0,95. Untersucht man die Zuverlässigkeit des Tests für tiefgefrorenes und wieder aufgetautes Tumorcycosol, so konnten wir an einer Fallzahl von $n=17$ eine Korrelation von 0,75 ermitteln. Für diese Gruppe von Tumorcycosolen ergibt die Steigung der Gerade nur einen Wert von 0,69, was bedeutet, daß die Rezeptorwerte im Mittel mit dem Enzymimmunoassay höher als mit dem DCC-Verfahren gemessen werden. Daraus kann man schließen, daß beim Prozeß der Tiefgefrierung und anschließenden Wiederaufarbeitung im Assay bislang unbekannte Denaturierungsprozesse an den Rezeptorproteinen ablaufen, die zu einer gewissen Qualitätseinbuße und eventuell zu einem Rezeptorverlust führen, was sich in dem geringeren Korrelationskoeffizienten und dem kleineren Neigungswinkel der Geraden für die tiefgefrorenen Tumorcycosole äußert.

Unter der Prämisse, daß für klinische Entscheidungen bezüglich der Hormonabhängigkeit eines Mammakarzinoms im wesentlichen eine qualitative Aussage über den Rezeptorstatus von Bedeutung ist, lassen sich die Meßwerte auch rein qualitativ vergleichen. Wir finden in 46 von 51 Tumormproben, d.h. in 90 % eine Übereinstimmung, wobei in 29 Fällen die Tumoren mit beiden Verfahren östrogenrezeptorpositiv und in 17 Fällen östrogenrezeptornegativ sind. Nur in fünf Fällen (10 %) weichen die beiden Methoden voneinander ab: mit dem Enzymimmunoassay lassen sich Östrogenrezeptoren nachweisen, mit dem DCC-Assay ist kein Rezeptornachweis möglich.

Vergleicht man beide Verfahren hinsichtlich des Rezeptorgehalts, wobei die Rezeptorwerte in Gruppen von kleiner 10 fmol/mg Protein (= rezeptornegativ), 10-50 fmol/mg Pro-

tein, 51-100 fmol/mg Protein und größer 100 fmol/mg Protein eingeteilt wurden, so zeigen sich bei den 29 Tumorproben, die sowohl mit dem Enzymimmunoassay als auch mit dem Dextransorbitrungsverfahren positiv sind, keine großen Unterschiede. Nur in acht Fällen beträgt der Rezeptorgehalt im Enzymimmunoassay mehr als 100 fmol/mg Protein, im DCC-Assay finden sich die Werte in der Gruppe zwischen 51 und 100 fmol/mg Protein. Genau umgekehrt verhält es sich bei drei Fällen. Im Enzymimmunoassay liegen die Rezeptorwerte zwischen 51 und 100 fmol/mg Protein, im DCC-Assay über 100. Ein größerer Unterschied im Rezeptorgehalt von mehr als 50 fmol/mg Protein tritt bei den 29 Fällen im Wertebereich zwischen 10 und 100 fmol kein einziges Mal auf. Damit läßt sich bereits der Schluß rechtfertigen, daß der Enzymimmunoassay insbesondere in Hinblick auf seine einfachere Durchführbarkeit, zur qualitativen und grob quantitativen Aussage über den Hormonrezeptorstatus mindestens die gleiche Zuverlässigkeit besitzt wie das Dextransorbitrungsverfahren.

Da der Enzymimmunoassay und das Dextransorbitrungsverfahren bei frischen Tumorzytosolen gut korrelieren, erheblich geringer für tiefgefrorenes Tumorzytosol, bleibt die Frage offen, welche der beiden angewandten Methoden bezüglich des verwendeten Ausgangsmaterials störanfälliger ist. Untersucht man mit dem Enzymimmunoassay frisch hergestellte Tumorzytosole, friert diese in flüssigem Stickstoff für drei Wochen ein und bestimmt dieselben Proben erneut, so ergibt sich an einem Kollektiv von 14 Fällen eine Korrelation von 0,9. Die Steigung der dazugehörigen Gerade beträgt 0,73, die mittleren Rezeptorwerte werden also im frisch hergestellten Tumorzytosol etwas höher gemessen als in dem nach Tiefgefrierung. Möglicherweise kommt es durch den Gefrierungsvorgang zu einem geringen Rezeptorverlust. Die gute Korrelation zeigt jedoch, daß der Pro-

zeß des Tiefgefrierens keine wesentliche qualitative Beeinflussung der Meßwerte für den Enzymimmunoassay mit sich bringt und dieses Verfahren eine gute Reproduzierbarkeit aufweist. Somit liegt der Schluß nahe, daß sich eine Alteration der Rezeptorproteine durch den Gefrierungsvorgang im wesentlichen auf die Sensitivität des DCC-Assays auswirkt.

Durch Untersuchungen des Rezeptorgehalts beim Mammakarzinom an prä- und postmenopausalen Patientinnen ist bekannt, daß der Nachweis der Östrogenrezeptoren beim prämenopausalen Kollektiv quantitativ etwas geringer ist. Dies wird zurückgeführt auf eine Besetzung der Bindungsstellen durch endogene Östrogene. Da der Enzymimmunoassay nicht mit der spezifischen Hormonbindungsstelle des Rezeptormoleküls reagiert, sondern die Antigenerkennung davon unabhängig ist, soll untersucht werden, ob bei Tumoren, die im DCC-Assay östrogenrezeptornegativ und progesteronrezeptorpositiv sind, der Enzymimmunoassay nicht doch Bindungsstellen identifizieren kann, die durch endogene Steroide besetzt sind. An zehn Tumorproben von prämenopausalen Patientinnen konnten wir in 30 % zusätzlich mit dem Enzymimmunoassay Östrogenrezeptoren nachweisen. Der Rezeptorgehalt lag dabei zwischen 10 und 20 fmol/mg Protein. Am Kollektiv der postmenopausalen Patientinnen von $n=11$ ließ sich sogar noch in fünf von elf Fällen (45 %) zusätzlich der Östrogenrezeptor mit dem Enzymimmunoassay finden. Bei drei der fünf Fälle betrug der Rezeptorgehalt 10 bis 20 fmol/mg Protein, bei den anderen zwei Fällen lag er sogar in der Gruppe größer 20 fmol/mg Protein. Bei vier Fällen schließlich, bei denen der Menopausenstatus unklar zuzuordnen war, konnte man immerhin noch in zwei Fällen den Östrogenrezeptor nachweisen, in einem Fall betrug der Rezeptorgehalt 10 bis 20 fmol/mg Protein, bei der anderen Tumorprobe mehr als 20 fmol/mg Protein. Aus

diesen Ergebnissen kann man schließen, daß in der Tat bei prämenopausalen Patientinnen im DCC-Assay ein erheblicher Teil der Tumoren wegen der Besetzung der Bindungsstellen durch endogene Steroide als Östrogenrezeptornegativ eingestuft wird. Ob die mit dem sensitiveren Enzymimmunoassay erzielte höhere Ausbeute an Östrogenrezeptoren jedoch allein dadurch erklärt werden kann, daß endogene Steroide Bindungsstellen besetzen, bleibt offen. Möglicherweise spielen noch andere hormonelle Vorgänge eine Rolle, zumal auch bei postmenopausalen Patientinnen und solchen, bei denen der Menopausenstatus nicht eindeutig festgelegt werden konnte, mit dem Enzymimmunoassay zusätzliche Östrogenrezeptoren gefunden werden können.

Unsere Ergebnisse sollen mit den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen über die Qualität des Enzymimmunoassays verglichen werden. Eine europäische Multizenterstudie (Leclercq et al., 1984) wurde durchgeführt, um die Genauigkeit der neuen enzymimmunochemischen Methode zu testen. Dabei wurden 75 menschliche Mammakarzinome sowohl mit dem ER-EIA als mit einer Routinemethode (meist DCC) analysiert. Es ergab sich eine ausgezeichnete Korrelation zwischen ER-EIA und DCC. Eine ähnliche Untersuchung aus den Vereinigten Staaten (Jordan et al., 1984) bestätigt mit Korrelationskoeffizienten von 0,92 bis 0,97 die gute Reproduzierbarkeit des neuen Verfahrens. Die Arbeitsgruppe um Martin (1984) studierte den Einfluß einer Kühlung in flüssigem Stickstoff auf die Zuverlässigkeit des Rezeptornachweises im ER-EIA und in einem Routineverfahren. Dabei ergaben sich selbst bei Kühlzeiten bis zu 24 Monaten noch Korrelationen von 0,92 bis 0,97.

Da das EIA-Verfahren einfach durchzuführen ist, eine geringe Tumormenge benötigt und auch keine Szintillationszählung wie der DCC-Assay erfordert, ist diese Methode im Hinblick auf alle oben genannten Ergebnisse ein Fort-

schritt für den Nachweis und die Charakterisierung der Hormonabhängigkeit menschlicher Mammakarzinome.

3.1.2 Vergleich immunocytochemischer Assay, Enzymimmunoassay und DCC-Assay

Um einen Vergleich zwischen immunocytochemischem Verfahren, Enzymimmunoassay und Dextrankohleverfahren anstellen zu können, haben wir 23 Mammakarzinome simultan mit allen drei Methoden untersucht. Für den immunocytochemischen Rezeptornachweis verwendeten wir keine Gewebsschnitte, sondern Tumorabklatschpräparate, da auf diese Weise schneller und einfacher Östrogenrezeptoren in den Zellkernen dargestellt werden können. Außerdem variierten wir die Fixierzeiten in Formaldehyd-PBS (15 Minuten bzw. zwei Stunden), um dadurch eventuell eine intensivere Braunfärbung und somit einen besseren Rezeptornachweis zu erzielen (s. 1.2.3.2). Aus mehreren durchgeführten Versuchen läßt sich der Schluß ziehen, daß Unterschiede in der Fixierzeit der Abklatschpräparate keinen Einfluß auf die qualitative Rezeptornachweismöglichkeit haben.

Die Abbildung 8 zeigt ein mit allen drei Methoden (ERICA, EIA, DCC) rezeptorpositives Mammakarzinom. Die intensive Braunfärbung der Kerne ist über das gesamte Präparat verteilt deutlich zu sehen. Das Tumorabklatschpräparat der Abbildung 9 ist ein Beispiel für ein mit dem immunocytochemischen Assay rezeptornegatives Mammakarzinom. In der Ausschnittvergrößerung sind ungefärbte Tumorzellkerne zu sehen. Hier ist eventuell eine rezeptornegative Unterpopulation erfaßt, im Gesamthomogenisat ergibt sich für Enzymimmunoassay und DCC-Assay ein deutlich rezeptorpositiver Wert.

Vergleicht man die Ergebnisse von immunocytochemischem Assay und Enzymimmunoassay, so findet man in 18 von 23 Tumormproben, d.h. in 78 %, eine qualitative Übereinstimmung, wobei in 14 Fällen die Tumoren mit beiden Verfahren Östrogenrezeptorpositiv und in vier Fällen Östrogenrezeptornegativ sind. Nur in fünf Fällen unterscheiden sich beide Verfahren: mit dem Enzymimmunoassay lassen sich Östrogenrezeptoren nachweisen, mit dem immunocytochemischen Verfahren ist jedoch keine Braunfärbung zu erzielen, also kein Östrogenrezeptor zu finden. Möglicherweise sind in diesen Fällen wie vielleicht auch im Präparat der Abbildung 9, rezeptornegative Unterpopulationen im immunocytochemischen Verfahren erfaßt worden.

Betrachtet man dazu die Ergebnisse der Rezeptorbestimmung mit immunocytochemischem Assay und Dextrankohleverfahren, so liegt für diese Versuche die qualitative Übereinstimmung mit einer Quote von 70 % niedriger. 16 der 23 Tumormproben korrelieren miteinander, von diesen sind elf Fälle mit beiden Methoden Östrogenrezeptorpositiv und fünf Fälle Östrogenrezeptornegativ. Eine Abweichung zwischen beiden Verfahren finden wir in sieben von 23 Fällen (30 %). Drei Fälle sind mit dem DCC-Assay rezeptornegativ bei rezeptorpositivem immunocytochemischem Assay, vier Fälle sind mit dem DCC-Assay rezeptorpositiv, mit dem immunocytochemischen Verfahren ist kein Rezeptornachweis möglich. Auch hier könnten rezeptornegative Verbände eines sonst rezeptorpositiven Mammakarzinoms erfaßt worden sein. Doch könnten die Unterschiede auch darauf beruhen, daß die Gewebeproben, die für die Herstellung des Tumorcitosols und des Tumorabklatschpräparates verwendet wurden, aus verschiedenen Anteilen des Tumors stammen.

Unsere Ergebnisse stimmen überein mit den Mitteilungen von Greene (1984), der in einer Studie von 117 Mammakarzinomen zeigen konnte, daß das Vorhandensein der Kernfär-

bung mit der enzymimmunochemischen Methode signifikant mit der Konzentration cytosolischer Östrogenrezeptoren übereinstimmt. Dabei entsprachen die Intensität der Färbung und der Anteil der gefärbten Tumorzellen deutlich der Rezeptorkonzentration, die im Steroidbindungsassay gemessen wurde. Greene zieht daraus den Schluß, daß die ERICA-Methode vor allem dazu geeignet ist, in östrogenrezeptorpositiven Tumoren Subpopulationen rezeptornegativer Zellen zu identifizieren. Ähnliche Ergebnisse berichten Bojar und Ertl (1984), die eine gute Übereinstimmung zwischen Enzymimmunassay, Radioligandenassay (DCC) und immunocytochemischem Assay finden. Auch in dieser Studie korreliert das Ausmaß der Färbung signifikant mit dem cytosolischen Östrogenrezeptorgehalt (EIA, DCC). Bojars Untersuchungen zeigen, daß die meisten rezeptorpositiven Mammakarzinome Verbände rezeptornegativer Zellen enthalten. Ebenfalls eine gute Korrelation zwischen immunocytochemischem Assay und biochemischem Assay erzielten De Sombre und Mitarbeiter (1984). Sie vermuten, daß sowohl Intensität als auch Verteilung der Tumorkernfärbung als wichtigste Parameter für das immunocytochemische Verfahren klinisch relevante Informationen für Therapieerfolg und Prognose des Mammakarzinoms liefern könnten.

Es bleibt abzuwarten, ob uns die Heterogenität der Tumorzellfärbung helfen kann, jene Patientinnen herauszufinden, die im biochemischen Assay rezeptorpositiv sind, aber nicht auf eine endokrine Therapie ansprechen. Da bislang aber die Beziehung zwischen dem Muster der Tumorzellfärbung und dem Ansprechen auf eine endokrine Behandlungsmaßnahme noch nicht bekannt ist, kann der immunocytochemische Assay die quantitative biochemische Rezeptoranalyse nicht ersetzen, sondern lediglich zusätzliche Informationen über regionale Variationen im Rezeptorgehalt des Tumorgewebes liefern.

3.2 Ovarialkarzinom

3.2.1 Steroidrezeptoren in Ovarialkarzinomen

Die Untersuchungen über das Vorkommen von Steroidrezeptoren haben wir an einer Gesamtzahl von 44 epithelialen Ovarialkarzinomen verschiedener histologischer Untergruppen mit dem Dextransorbitabsorptionsverfahren durchgeführt. Wie auch beim Mammakarzinom wurden die Tumoren ab 10 fmol/mg cytosolisches Protein als rezeptornegativ eingestuft. In 20 von 44 (46 %) Gewebeproben lassen sich Östrogenrezeptoren und in 17 von 44 (39 %) Gewebeproben Progesteronrezeptoren nachweisen. Der mittlere Rezeptorgehalt liegt mit 40 fmol/mg Protein bei den Progesteronrezeptoren geringfügig höher als bei den Östrogenrezeptoren. Bei diesen beträgt er 35 fmol/mg Protein. Auch die Streuung der Rezeptorwerte ist bei den Progesteronrezeptoren größer als bei den Östrogenrezeptoren. Für erstere konnten wir Rezeptorwerte zwischen 10 und 191 fmol/mg Protein ermitteln. Die Werte für Östrogenrezeptoren liegen im Bereich zwischen 16 und 83 fmol/mg Protein. Der simultane Nachweis beider Rezeptoren ist in neun Fällen (21 %) möglich, auch hier liegt der mittlere Progesteronrezeptorgehalt mit 53 fmol/mg Protein höher als der der Östrogenrezeptoren mit 32 fmol/mg Protein. Bei 16 Tumorsproben (36 %) sind keine Rezeptoren vorhanden. Die Kombination östrogenrezeptorpositiv und progesteronrezeptornegativ tritt in elf Fällen (25 %) auf. Für diese Gruppe beträgt der mittlere Östrogenrezeptormesswert, ähnlich wie schon für die oben beschriebenen Gruppen, 38 fmol/mg Protein. Acht Karzinome zeigen die Kombination östrogenrezeptornegativ und progesteronrezeptorpositiv, wobei hier der mittlere Progesteronrezeptorgehalt mit 25 fmol/mg Protein niedriger liegt als bei den übrigen Gruppen mit positiven Progester-

ronrezeptoren. Vergleicht man die Östrogen- und Progesteronrezeptormesswerte von Mammakarzinom und Ovarialkarzinom, so fällt auf, daß der Gehalt in den Mammakarzinomen generell höher ist als in den Ovarialkarzinomen, bei denen die Werte obere Grenzen von etwa 100 fmol/mg cytosolisches Protein sehr selten, in unserem Kollektiv nur in einem Fall (191 fmol/mg Protein) überschreiten.

Die Arbeitsgruppe von Wilcocks (1983) untersuchte 49 Ovarialmalignome und fand davon in 20 Fällen mehr als 10 fmol/mg Östrogenrezeptoren (41 %). In 14 Fällen (29 %) ließen sich Progesteronrezeptoren nachweisen. Vergleich man diese Ergebnisse mit dem Rezeptornachweis in benignen Ovarialtumoren und normalem Ovarialgewebe, so war der Rezeptor im Malignom hochsignifikant häufiger im Vergleich zu nicht neoplastischem Gewebe nachzuweisen. In 65 % der Malignome ließen sich der Östrogen-, der Progesteronrezeptor oder beide Rezeptoren nachweisen. In unserem Kollektiv läßt sich dies bei 64 % der Fälle bestätigen. Die Gruppe der Malignome, bei der lediglich der Progesteronrezeptor nachweisbar ist, war zahlenmäßig am kleinsten, was auch wir bestätigen können. Unsere Daten zeigen in Übereinstimmung mit der zitierten Studie, daß Östrogenrezeptoren allein oder in Kombination mit dem Progesteronrezeptor in nahezu der Hälfte der Ovarialkarzinome vorkommen. Die biologische Bedeutung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Ovarialkarzinom ist allerdings noch unklar. Möglicherweise handelt es sich gar nicht um wirkliche Rezeptoren, sondern um Bindungsstellen, die nicht in den Zellkern transloziert werden können und daher keinen biologischen Effekt auslösen. Aus einer Reihe von Tatsachen muß allerdings geschlossen werden, daß es sich doch um wirkungsvermittelnde Rezeptoren handelt. Einerseits haben diese Rezeptorproteine die gleichen physikochemischen Eigenschaften wie andere Steroidrezeptoren, zum anderen ist

der Nachweis eines Progesteronrezeptors ein Indiz für die vorher Östrogenvermittelte Hormonwirkung. Schließlich lassen sich Östrogenrezeptoren auch immunocytochemisch im Zellkern der Karzinome nachweisen (vergleiche 2.2.12 - 2.2.14).

3.2.2 Steroidrezeptoren in Abhängigkeit vom histologischen Typ

Wir konnten die von uns untersuchten 44 Ovarialkarzinome in die histologischen Typen eines serösen, muzinösen, endometrioiden und entdifferenzierten Tumorwachstums einteilen. Die prozentuale Verteilung der einzelnen Steroidrezeptoren und ihre Kombination müssen mit Vorbehalt gesehen werden, da die einzelnen histologischen Gruppen zahlenmäßig verschieden groß sind. Es zeigt sich, daß in allen histologischen Untergruppen Steroidhormonrezeptoren in unterschiedlicher Häufigkeit nachgewiesen werden können. Die meisten Ovarialkarzinome sind als seröser oder endometrioider Bautyp zu klassifizieren. In der mit 24 Karzinomen größten Gruppe der serösen Karzinome lassen sich in elf Fällen (46 %) Östrogenrezeptoren und in neun Fällen (38 %) Progesteronrezeptoren nachweisen. Für die endometrioiden Karzinome finden sich ähnliche Werte: sechs von zehn Tumoren (60 %) sind östrogenrezeptorpositiv, vier Karzinome (40 %) progesteronrezeptorpositiv. Auch die kleine Gruppe der muzinösen Karzinome unterscheidet sich davon kaum, im Gegensatz zu einer Studie von Kauppila (1983), in der muzinöse Karzinome seltener als seröse und endometrioiden Karzinome Rezeptoren aufwiesen: in zwei von fünf Fällen sind Östrogenrezeptoren und in drei von fünf Fällen Progesteronrezeptoren vorhanden. Bei den entdifferenzierten Karzinomen findet sich ein prozen-

tual geringerer rezeptorpositiver Anteil: jeweils nur eine von fünf Tumorproben ist östrogen- oder progesteronrezeptorpositiv. Untersucht man die Kombinationen beider Rezeptortypen, so wird deutlich, daß die einzelnen histologischen Typen nur gering voneinander abweichen. Lediglich die Kombination negative Östrogen- und Progesteronrezeptoren kommt bei serösen Karzinomen mit zehn von 24 Fällen (42 %) ungefähr doppelt so häufig vor als bei muzinösen Karzinomen mit einem von fünf Fällen (20 %) und endometrioiden Karzinomen mit zwei von zehn Fällen (20 %). Dieselbe Kombination (ER-/PR-) findet sich bei entdifferenzierten Karzinomen mit drei von fünf Fällen (60 %) sogar dreimal so häufig. Doch ist vor allem letztere Zahl, wie schon oben erwähnt, mit Vorbehalt zu sehen, da die Fallzahl für diese Gruppe sehr gering ist. Unsere Untersuchung zeigt, daß sich ein Schluß von einer bestimmten Kombination der Östrogen- und Progesteronrezeptoren auf den histologischen Bautyp des Ovarialkarzinoms nicht ziehen läßt.

Teufel und Mitarbeiter (1983) wagen selbst bei einem Gesamtkollektiv von 149 Gewebeproben auf Grund der zahlenmäßig sehr unterschiedlichen Größe der einzelnen histologischen Gruppen keine definitive Zuordnung zwischen Rezeptorstatus und Bautyp. Allerdings haben in ihrer Untersuchung seröse Karzinome erheblich häufiger Östrogen- als Progesteronrezeptoren, bei endometrioiden Karzinomen findet sich dreimal häufiger als bei serösen Karzinomen die Kombination negative Östrogen- und positive Progesteronrezeptoren. Alle übrigen Kombinationen beider Rezeptortypen lassen keine Unterschiede zwischen den histologischen Typen erkennen. Dies bestätigt sich auch bei den von uns untersuchten 44 Fällen. Schwartz und Mitarbeiter (1985) konnten in ihrer Untersuchung an 113 epithelialen Ovarialkarzinomen ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen Östro-

gen- und Progesteronrezeptorgehalt und histologischem Bautyp feststellen.

3.2.3 Steroidrezeptoren und Differenzierungsgrad

Faßt man alle 44 untersuchten Ovarialkarzinome, unabhängig von histologischen Tumormerkmalen, nach Differenzierungsgraden (G I - G III) zusammen, so ergibt sich, daß zwischen der Häufigkeit des Rezeptornachweises und der Differenzierung keine eindeutige Beziehung besteht.

Es finden sich in der mit 25 von 44 Fällen größten Gruppe der entdifferenzierten Karzinome in zehn Tumorproben (40 %) Östrogenrezeptoren, Progesteronrezeptoren sind ebenfalls in zehn Fällen (40 %) vorhanden. Bei den Karzinomen mit Differenzierungsgrad G II liegen die Zahlen prozentual noch höher. Fünf von sieben Fällen (71 %) sind Östrogenrezeptorpositiv und drei von sieben Fällen (43 %) progesteronrezeptorpositiv. Die hoch differenzierten Karzinome weisen in fünf von zwölf Fällen (42 %) Östrogenrezeptoren und in vier von zwölf Fällen (33 %) Progesteronrezeptoren auf. Mit diesen Ergebnissen läßt sich zeigen, daß eine Entdifferenzierung nicht mit einem Rezeptorverlust einhergeht. Diesen Schluß zieht auch Teufel (1983), er vermutet aber darüberhinaus sogar eine umgekehrte Beziehung, da in seiner Untersuchung Östrogen- und Progesteronrezeptoren bei Tumoren mit Differenzierungsgrad I seltener positiv waren als bei Tumoren mit Differenzierungsgrad II und III. Dies können wir nicht bestätigen. Doch fällt auf, wenn man die verschiedenen Rezeptorkombinationen betrachtet, daß bei hochdifferenzierten Tumoren nur in einem von zwölf Fällen (8 %) sowohl Östrogen- als auch Progesteronrezeptoren vorkommen, bei entdifferenzierten Tumoren immerhin in fünf von 25 Fällen (20 %). Aus diesen

Zahlen läßt sich jedoch nicht folgern, daß eine Entdifferenzierung mit einer Zunahme von Rezeptoren einhergeht. In einer weiteren Studie, in der 30 epitheliale Ovarialkarzinome untersucht wurden, konnte ebenfalls gezeigt werden, daß das Vorkommen von Hormonrezeptoren und die Differenzierung der Tumoren voneinander unabhängig sind (Schwartz et al., 1982a).

3.2.4 Vergleich Enzymimmunoassay und DCC-Assay

Während wir bei Verwendung frischen und wieder aufgetauten tiefgefrorenen Tumorcytosols in der Simultananwendung des Enzymimmunoassays und des Dextrankohleadsorptionsverfahrens zum Östrogenrezeptornachweis beim Mammakarzinom an 51 Fällen eine gute Korrelation von 0,9 feststellen konnten, ist bei der gleichen Untersuchung für 39 untersuchte Ovarialkarzinome lediglich eine Korrelation von 0,64 zu ermitteln. Die Steigung der zu den Rezeptorwerten erstellten Gerade beträgt 0,69, im Unterschied zu 0,92 für die entsprechende Untersuchung an Mammakarzinomen. Dies zeigt, daß für Ovarialkarzinome mit dem Enzymimmunoassay höhere mittlere Rezeptorwerte als mit dem DCC-Assay gemessen werden. Beim Mammakarzinom läßt sich die Korrelation zwischen beiden Methoden bei Untersuchung nur frisch hergestellten Tumorcytosols etwas verbessern (0,92), dies können wir auch für 23 Fälle von Ovarialkarzinomen bestätigen. Allerdings steigt die Korrelation lediglich auf 0,77. Der Wert für die Steigung der dazugehörigen Gerade erhöht sich auf 0,81, liegt aber dennoch weit niedriger als beim Mammakarzinom mit 0,95. Eine deutlich schlechtere Korrelation von 0,75 mit einer Steigung der entsprechenden Gerade von 0,69 zwischen beiden Methoden ergibt sich bei Mammakarzinomen, wenn man nur Tumorcytosol ver-

wendet, das zwischen der Herstellung und der Verarbeitung im Assay tiefgefroren war. Führt man die gleiche Untersuchung bei Ovarialkarzinomen durch, so kann man an einer Fallzahl von 16 Tumoren keinen Zusammenhang zwischen beiden Methoden mehr nachweisen. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,37, die Steigung der Gerade 0,45, die mit beiden Methoden ermittelten Rezeptormesswerte weichen also erheblich voneinander ab und werden mit dem Enzymimmunoassay im Mittel viel höher bestimmt. Daraus wird deutlich, daß für den Nachweis des Östrogenrezeptors in Ovarialkarzinomen zusätzliche methodische Probleme der Extraktion des Rezeptorproteins ins Homogenisat auftreten, da die Werte gegenüber dem Mammakarzinom in allen drei Fällen erheblich schlechter sind. Außerdem scheinen die Östrogenrezeptorproteine beim Ovarialkarzinom durch den Vorgang des Tiefgefrierens stärker alteriert zu werden als beim Mammakarzinom.

Vergleicht man den Rezeptorstatus beider Methoden (EIA, DCC) rein qualitativ, so besteht immerhin noch bei 31 Fällen (80 %) eine Übereinstimmung, wobei bei elf Fällen die Tumoren mit beiden Verfahren östrogenrezeptorpositiv und bei 20 Fällen, also prozentual wesentlich höher als beim Mammakarzinom, östrogenrezeptornegativ sind. In acht Fällen (20 %) führen die beiden Methoden zu einem unterschiedlichen Ergebnis: bei vier Tumorproben lassen sich mit dem Enzymimmunoassay Östrogenrezeptoren nachweisen, mit dem Dextrankohleverfahren ist kein Rezeptornachweis möglich, bei den anderen vier Tumorproben verhält es sich umgekehrt. Betrachtet man dazu die entsprechenden Werte für Mammakarzinome, so zeigt sich, daß beim qualitativen Vergleich der Rezeptorwerte der zwei Methoden der Unterschied zwischen beiden Karzinomarten bei weitem nicht so groß ist (Mammakarzinom: Übereinstimmung in 90 %, Ovarialkarzinom in 80 %) als beim quantitativen Rezeptormesswert-

vergleich.

Wie auch beim Mammakarzinom haben wir beide Verfahren hinsichtlich des Rezeptorgehalts grob quantitativ verglichen und auch hier die Rezeptorwerte in Gruppen kleiner 10 fmol/mg Protein (= rezeptornegativ), 10-50 fmol/mg Protein, 51-100 fmol/mg Protein und größer 100 fmol/mg Protein zusammengefaßt. Für die elf Tumorproben, die mit beiden Verfahren östrogenrezeptorpositiv sind, zeigen sich nur geringe Differenzen, ein größerer Unterschied im Rezeptorgehalt tritt im Wertebereich zwischen 10 und 100 fmol kein einziges Mal auf. Auch bei den acht Fällen, die mit beiden Verfahren qualitativ nicht übereinstimmen (EIA+/DCC- oder EIA-/DCC+), findet sich nur in einem Fall ein höherer Östrogenrezeptorgehalt (EIA: 51-100 fmol/mg Protein, DCC negativ), die anderen sieben Tumorproben weisen einen Rezeptorgehalt zwischen 10 und 50 fmol/mg Protein auf. Wie schon unter Punkt 3.2.1 erwähnt, fällt auch hier auf, daß nur in einem von 39 Fällen der Rezeptormesswert mehr als 100 fmol/mg Protein (gemessen im DCC-Assay) beträgt, bei den Mammakarzinomen liegen immerhin neun von 51 Meßwerten in dieser Wertegruppe.

Um nun herauszufinden, welche der beiden biochemischen Methoden beim Rezeptornachweis im Ovarialkarzinom die größeren Nachteile aufweist, wurde frisch verarbeitetes Tumorcytosol mit dem Enzymimmunoassay gemessen, anschließend für drei bis vier Wochen tiefgefroren und danach nochmals bestimmt. Es ergibt sich an einer Fallzahl von elf Tumoren eine ausgezeichnete Korrelation von 0,97, der Enzymimmunoassay weist somit eine gute Reproduzierbarkeit auf. Die entsprechende Gerade verläuft mit einer Steigung von 1,15. Es werden also, im Gegensatz zu dem identischen Versuch an Mammakarzinomen, im frisch hergestellten Tumorcytosol etwas niedrigere Rezeptorwerte gemessen als in dem nach Tiefgefrierung. Es ist somit unwahrscheinlich, daß

es, wie für Mammakarzinome vermutet, durch den Gefrierungsvorgang zu einem Rezeptorverlust kommt. Die ermittelten Werte zeigen einmal mehr, daß die inhärenten methodischen Nachteile des DCC-Assays auch bei schwieriger zu verarbeitenden Tumoren wie dem Ovarialkarzinom überwiegen und sich der Prozeß des Tiefgefrierens durch eine Veränderung der Rezeptormoleküle hauptsächlich auf die Sensitivität des DCC-Assays auswirkt, d.h. die Steroidbindungsstelle am Rezeptorprotein empfindlicher ist als die davon unabhängige antigene Determinante des hier verwendeten Antikörpers (Greene et al., 1980).

3.2.5 Vergleich immunocytochemischer Assay, Enzymimmunoassay und DCC-Assay

Am Vergleich dreier Methoden zum Nachweis des Östrogenrezeptors bei Ovarialkarzinomen soll untersucht werden, inwieweit die Ergebnisse untereinander identisch sind (ERICA, EIA, DCC).

Dazu haben wir die Östrogenrezeptoren simultan mit allen drei Verfahren an einer Gesamtzahl von dreizehn Tumoren gemessen. Wie auch bei Mammakarzinomen verwendeten wir für den immunocytochemischen Rezeptornachweis keine Gewebsschnitte, sondern Tumorabklatschpräparate. Doch bleibt zu bemerken, daß methodische Probleme bei der Herstellung des Abklatschpräparates besonders bei Ovarialkarzinomen auftauchen. Die Haftung der Zellen an der Objektträgeroberfläche ist im Vergleich entsprechender Präparationen des Mamma- oder Korpuskarzinoms deutlich geringer. Die Abbildung 14 zeigt ein mit dem immunocytochemischen Verfahren rezeptorpositives Ovarialkarzinom von histologisch serösem Bautyp und geringem Differenzierungsgrad. Deutlich ist in dem Tumorzellverband die Braunfärbung der

Zellkerne zu erkennen. Im Enzymimmunoassay konnte nur ein schwach positiver Östrogenrezeptorwert ermittelt werden, im DCC-Assay war kein Rezeptornachweis möglich. Auf der Abbildung 15 ist das Tumorabklatschpräparat eines Ovarialkarzinoms histologisch serösen Bautyps mit hohem Differenzierungsgrad zu sehen. Die zusammenhängende Zellpopulation ist mit dem immunocytochemischen Verfahren rezeptornegativ, die Zellkerne sind ungefärbt. Auch im DCC-Assay ist kein Rezeptor nachweisbar, der Enzymimmunoassay liefert nur einen grenzwertig positiven Befund.

Stellt man einen Vergleich zwischen immunocytochemischem Assay und Enzymimmunoassay an, so findet man in sieben von dreizehn Tumorproben, d.h. in 54 % eine qualitative Übereinstimmung. In fünf Fällen (71 %) sind die Tumoren mit beiden Verfahren östrogenrezeptornegativ und in nur zwei Fällen (29 %) östrogenrezeptorpositiv. In sechs von dreizehn Fällen, also in knapp der Hälfte der Tumorproben, unterscheiden sich die beiden Methoden voneinander: mit dem Enzymimmunoassay lassen sich Östrogenrezeptoren nachweisen, mit dem immunocytochemischen Verfahren ist jedoch kein Rezeptor nachweisbar. In der entsprechenden Untersuchung an Mammakarzinomen zeigte sich eine wesentlich höhere Übereinstimmung von 78 %.

Auch Dextranskohleverfahren und immunocytochemischer Assay stimmen für Ovarialkarzinome nur in 62 % der Fälle überein (acht von dreizehn Tumorproben). Dieser Prozentsatz ist etwas besser als für die eben beschriebene Untersuchung. Von den acht Fällen sind sieben mit beiden Verfahren östrogenrezeptornegativ, nur in einem Fall sind mit beiden Methoden Östrogenrezeptoren zu finden. In vier Fällen lassen sich mit dem DCC-Assay Östrogenrezeptoren nachweisen, mit dem immunocytochemischen Verfahren ist kein Rezeptornachweis möglich. Eine Tumorprobe zeigt im immunocytochemischen Assay eine braune Kernfärbung, ist also

östrogenrezeptorpositiv, im DCC-Assay jedoch östrogenrezeptornegativ. Auch für diese Untersuchung konnte für Mammakarzinome eine bessere Übereinstimmung ermittelt werden (70 %), der Unterschied ist aber nicht so gravierend als der für den Vergleich von Enzymimmunoassay und immunocytochemischem Assay.

Offensichtlich sind mit allen drei genannten Nachweisverfahren weitere methodische Probleme bei der Anwendung an Ovarialkarzinomen vorhanden, so daß die Übereinstimmung der Methoden untereinander für das Ovarialkarzinom schlechter ausfällt (s. auch 3.2.4). Auffällig ist weiterhin, daß es mit dem immunocytochemischen Assay nur in zwei von dreizehn Fällen möglich war, den Tumor als östrogenrezeptorpositiv zu klassifizieren, mit dem Enzymimmunoassay immerhin in acht und mit dem DCC-Assay in fünf Fällen. Im Vergleich dazu konnten beim Mammakarzinom in 14 von 23 Fällen immunocytochemisch Östrogenrezeptoren nachgewiesen werden, im DCC-Assay in 16 und im Enzymimmunoassay in 19 Fällen. Ob diese bei Ovarialkarzinomen geringe Ausbeute mit dem immunocytochemischen Verfahren allein damit erklärt werden kann, daß rezeptornegative Zellverbände eines sonst positiven Karzinoms erfaßt wurden oder ob neben der Tumorerheterogenität andere Prozesse den Rezeptornachweis mit dieser Methode stören, bleibt offen.

3.3 Korpuskarzinom

3.3.1 Steroidrezeptoren in Korpuskarzinomen

In unserer Gesamtuntersuchung über Hormonrezeptoren in gynäkologischen Karzinomen waren auch sechs Korpuskarzinome zu analysieren. Alle untersuchten Korpuskarzinome sind adenoiden Bautyps. In drei von sechs Fällen läßt sich mit dem DCC-Assay der Östrogenrezeptor und in zwei von sechs Fällen der Progesteronrezeptor nachweisen. Zwei von sechs Fällen gestatten keinen Nachweis beider Rezeptortypen, in einem Fall sind beide positiv. Die Absolutwerte für den Östrogen- und Progesteronrezeptor (DCC-Assay) bewegen sich in einem Wertebereich, der etwa dem des Mammakarzinoms entspricht und damit deutlich höher liegt als beim Ovarialkarzinom.

Weiterhin zeigt sich, daß in einem entdifferenzierten Karzinom kein Progesteronrezeptor zu finden ist. Östrogenrezeptoren können wir in allen drei Differenzierungsarten nachweisen. Martin und Mitarbeiter (1983) bestätigen, daß zwischen dem Differenzierungsgrad und dem Östrogenrezeptorgehalt kein Zusammenhang besteht. Dennoch aber ist der Rezeptorgehalt in Ergänzung zum Differenzierungsgrad und der myometrialen Penetrationstiefe ein zusätzlicher prognostischer Faktor (Creasman et al., 1980). Der Nachweis des Progesteronrezeptors scheint positiv mit höherem Differenzierungsgrad korreliert zu sein (Carlson et al., 1984).

Ein Vergleich der beiden Methoden zur Östrogenrezeptorbestimmung (EIA, DCC) ergibt eine gute Übereinstimmung (fünf von sechs Tumorproben). Drei Tumorproben sind mit beiden Verfahren rezeptorpositiv, zwei mit beiden rezeptornegativ. In einem Fall lassen sich mit dem Enzymimmunoassay Östrogenrezeptoren nachweisen, mit dem DCC-Assay

ist kein Rezeptornachweis möglich. Der mit dem Enzymimmunoassay ermittelte Östrogenrezeptorgehalt liegt in derselben Größenordnung wie für das Dextrankohleverfahren.

3.3.2 Vergleich immunocytochemischer Assay, Enzymimmunoassay und DCC-Assay

Um die drei verschiedenen Methoden zum Nachweis des Östrogenrezeptors (ERICA, EIA, DCC) miteinander vergleichen zu können, haben wir fünf Korpuskarzinome mit allen drei Verfahren untersucht. Der immunocytochemische Rezeptornachweis wurde auch bei den Korpuskarzinomen an Tumorabklatschpräparaten durchgeführt.

Abbildung 16 zeigt ein mit allen drei Methoden (ERICA, EIA, DCC) östrogenrezeptorpositives Korpuskarzinom hohen Differenzierungsgrades. Der immunocytochemische Assay liefert für dieses Karzinom zusätzliche Informationen über die Heterogenität des Gesamttumors. Mehrere Bezirke rezeptorpositiver Karzinomzellen liegen in Inseln zusammen, dazwischen verstreut ist eine Unterpopulation rezeptornegativer Tumorzellen erkennbar. Auf der Abbildung 17 sieht man einen Tumorzellverband mit ungefärbten Zellkernen. Auch mit den beiden anderen Verfahren (EIA, DCC) ist kein Östrogenrezeptor nachweisbar.

Vergleicht man die Ergebnisse von immunocytochemischem Assay und Enzymimmunoassay, so ergibt sich eine gute Übereinstimmung. Vier der fünf untersuchten Karzinome sind mit beiden Verfahren östrogenrezeptorpositiv, ein Karzinom ist mit beiden Assays östrogenrezeptornegativ. Auch beim Vergleich von immunocytochemischem Verfahren und DCC-Assay zeigt sich eine gute Korrelation: vier von fünf Tumorproben stimmen qualitativ überein, drei davon sind mit beiden Assays östrogenrezeptorpositiv, ein Karzinom ist

mit beiden Nachweismethoden östrogenrezeptornegativ. Nur in einem Fall lassen sich mit dem immunocytochemischen Verfahren Östrogenrezeptoren nachweisen, mit dem DCC-Assay ist kein Rezeptornachweis möglich.

Daraus ergibt sich, daß für die Östrogenrezeptorbestimmung im Korpuskarzinom und im Mammakarzinom alle drei Methoden in einem größeren Zuverlässigkeitsbereich arbeiten als beim Ovarialkarzinom, bei dem erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Verfahren untereinander festzustellen sind. Offensichtlich sind für die Bestimmung der Östrogenrezeptoren im Ovarialkarzinom im Gegensatz zum Mamma- und Korpuskarzinom über die methodischen Probleme der jeweiligen Verfahren hinaus auch Probleme der Aufarbeitung des Tumormaterials für den Nachweis der Rezeptorproteine relevant.

3.4 Gesamtvergleich für den Rezeptornachweis bei allen Karzinomen:

3.4.1 Vergleich Enzymimmunoassay und DCC-Assay

Bestimmt man den Östrogenrezeptor an einer Gesamtzahl von 96 gynäkologischen Malignomen simultan mit dem Enzymimmunoassay und dem Dextranskohleverfahren, so ergibt sich eine Korrelation von 0,9 bei Verwendung frischen und aufgetauten tiefgefrorenen Tumorcytosols. Die Steigung der zu den Rezeptorwerten erstellten Gerade beträgt 0,89. Dies zeigt, daß die mit dem Enzymimmunoassay gemessenen Rezeptorwerte in etwa denen des DCC-Assays entsprechen. Wenn man nur frisch hergestelltes Tumorcytosol verwendet, läßt sich diese Korrelation bei 62 untersuchten Fällen auf 0,92 verbessern, der Wert für die Steigung der dazugehörigen Gerade erhöht sich auf 0,92, die mittleren Östrogenrezeptorwerte stimmen also noch besser überein. Weist man den Rezeptor nur an Tumorcytosol nach, das drei bis vier Wochen tiefgefroren war, so besteht zwischen den beiden Methoden der Östrogenrezeptorbestimmung bei 34 Fällen eine Korrelation von 0,78. Die für diese Rezeptormesswerte ermittelte Gerade verläuft mit einer Steigung von 0,71, was bedeutet, daß im Mittel mit dem Enzymimmunoassay höhere Rezeptorwerte gemessen werden. Aus diesen Zahlen ist ersichtlich, daß beide Methoden bei der Untersuchung frischen Tumorcytosols die zuverlässigsten Ergebnisse liefern. Durch den Prozeß des Tiefgefrierens und anschließenden Wiederaufarbeitens werden die Rezeptorproteine möglicherweise durch bislang unbekannte Denaturierungsprozesse alteriert.

Bei einem qualitativen Vergleich der Übereinstimmung zwischen Enzymimmunoassay und Dextranskohleverfahren zeigt sich in 82 von 96 Tumorproben (85 %) eine Korrelation.

Von diesen 82 Fällen sind 43 mit beiden Verfahren östrogenrezeptorpositiv und 39 östrogenrezeptornegativ. In 14 Fällen (15 %) weichen die beiden Methoden voneinander ab: zehn Tumorproben sind mit dem Enzymimmunoassay östrogenrezeptorpositiv, mit dem DCC-Assay ist kein Rezeptor nachweisbar. In vier Fällen verhält es sich umgekehrt, im DCC-Assay sind Rezeptoren vorhanden, im Enzymimmunoassay nicht.

Um die beiden Verfahren hinsichtlich des Rezeptorgehalts grob quantitativ vergleichen zu können, haben wir die Rezeptorwerte zu Gruppen von kleiner 10 fmol/mg Protein (= rezeptornegativ), 10-50 fmol/mg Protein, 51-100 fmol/mg Protein und größer 100 fmol/mg Protein eingeteilt. Dabei zeigt sich, daß die 43 Tumorproben, die mit beiden Nachweismethoden rezeptorpositiv sind, hinsichtlich des Rezeptorgehalts nur geringfügig voneinander abweichen. Elf Tumorproben zeigen mit beiden Verfahren einen Rezeptorgehalt von über 100 fmol/mg Protein. In neun Fällen beträgt der Rezeptorgehalt im Enzymimmunoassay mehr als 100 fmol/mg Protein, im DCC-Assay 51-100 fmol/mg Protein. Der umgekehrte Fall (DCC: >100 fmol/mg Protein, EIA: 51-100 fmol/mg Protein) tritt bei vier Fällen auf. Insgesamt findet sich jedoch in keinem Fall eine Abweichung von mehr als 50 fmol/mg Protein im Wertebereich zwischen 10 und 100 fmol. Auch bei den 14 Tumorproben, die mit beiden Verfahren qualitativ nicht übereinstimmen, findet sich nur in vier Fällen ein höherer Östrogenrezeptorgehalt von 51-100 fmol/mg Protein im Enzymimmunoassay (DCC negativ), die anderen zehn Tumorproben weisen einen Rezeptorgehalt zwischen 10 und 50 fmol/mg Protein auf.

Um die Reproduzierbarkeit des Enzymimmunoassays zu prüfen, wendeten wir den Test auf dasselbe Tumorcytosol im frischen Zustand und nach Tiefgefrierung an. Es ergibt sich für 25 untersuchte Fälle eine Korrelation von 0,89,

die dazugehörige Gerade zeigt eine Steigung von 0,82. Es werden also, wie auch bei der Untersuchung von Mammarkarzinomen allein, im frisch hergestellten Tumorcytosol etwas höhere mittlere Rezeptorwerte gemessen. Möglicherweise führt der Gefrierungsvorgang zu einem geringen Rezeptorverlust. Die ermittelte Korrelation ist deutlich besser als die Korrelation zwischen dem Enzymimmunoassay und dem Dextranskohleassay bei Verwendung von nur tiefgefrorenem Tumorcytosol ($0,89 > 0,78$). Das zeigt, daß der Prozeß der Tiefgefrierung des Tumorcytosols vor allem eine Einbuße beim Rezeptornachweis des Dextranskohleassays mit sich bringt. Dies ist auch aus theoretischen Überlegungen heraus zu erwarten, da die Spezifität der Antigenerkennung, d.h. die Erkennung des Östrogenrezeptors durch den zugeordneten monoklonalen Antikörper, wesentlich größer ist als die Erkennung der Hormonbindungsstelle des Rezeptors durch zugegebene markierte Substanzen.

3.4.2 Vergleich immunocytochemischer Assay, Enzymimmunoassay und DCC-Assay

Faßt man alle Tumorproben, die mit den drei Nachweismethoden für Östrogenrezeptoren simultan untersucht wurden, zusammen und vergleicht zuerst Enzymimmunoassay und DCC-Assay, so ergibt sich eine Übereinstimmung von 73 % (30 von 41 Fällen). 20 Tumorproben sind mit beiden Verfahren Östrogenrezeptorpositiv, zehn Östrogenrezeptornegativ. Diese Korrelation entspricht in etwa der bei Untersuchung von Mammarkarzinomen allein (78 %), ist erheblich besser als für Ovarialkarzinome (54 %). In elf Fällen lassen sich mit dem Enzymimmunoassay Östrogenrezeptoren nachweisen, mit dem immunocytochemischen Assay ist kein Rezeptornachweis möglich.

Die qualitative Übereinstimmung von DCC-Assay und immunocytochemischem Assay ist mit einer Quote von 68 % etwas geringer (28 von 41 Fällen). Hier können nur in 15 Fällen mit beiden Verfahren Rezeptoren nachgewiesen werden, dreizehn Fälle sind mit beiden Methoden östrogenrezeptornegativ. Auch diese Korrelation stimmt gut überein mit der für Mammakarzinome (70 %). In dreizehn von 41 Fällen unterscheiden sich beide Verfahren voneinander. Acht Fälle sind mit dem DCC-Assay östrogenrezeptorpositiv, mit dem immunocytochemischen Assay östrogenrezeptornegativ. Bei fünf Tumorproben verhält es sich umgekehrt.

Das immunocytochemische Verfahren liefert zusätzliche Informationen über die Heterogenität der Östrogenrezeptorverteilung innerhalb des Tumorgewebes. Ob jedoch eine Beziehung zwischen der Tumorzellverteilung und dem Ansprechen auf eine endokrine Therapie besteht, muß noch untersucht werden. Als qualitatives Nachweisverfahren kann der immunocytochemische Assay die quantitative Rezeptoranalyse nicht ersetzen, nur ergänzen.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit vergleicht den Steroidrezeptornachweis in gynäkologischen Malignomen dreier verschiedener Herkunftsorte (Mamma, Ovar, Corpus uteri). Simultan zur Rezeptorbestimmung mit dem Dextrankohleadsorptionsverfahren wurden zwei neuere Methoden verwendet, die Östrogenrezeptoren im humanen Tumorgewebe mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers erkennen (Enzymimmunoassay, immunocytochemischer Assay). Generell ergibt sich für alle untersuchten Malignome eine gute Korrelation zwischen den Ergebnissen des Enzymimmunoassays und des Dextrankohleadsorptionsverfahrens. Hierzu sind auch die Ergebnisse des immunocytochemischen Assays kompatibel. Unterteilt man die Karzine bezüglich ihrer Herkunft, so zeigt sich, daß für das Mamma- und Korpuskarzinom die drei Methoden am besten untereinander vergleichbar sind. Das Problem der Darstellung von Hormonrezeptoren im Ovarialkarzinom scheint über methodische Probleme der einzelnen Verfahren hinaus noch mit zusätzlichen Schwierigkeiten belastet zu sein, da die mit den einzelnen Techniken gemessenen Werte zum Teil erheblich differieren. Für das Ovarialkarzinom wurde darüberhinaus die Verteilung der Östrogen- und Progesteronrezeptorwerte untersucht (DCC- Assay). Die Hormonrezeptoren lassen sich beim Ovarialkarzinom in allen histologischen Typen nachweisen, doch kann die Bevorzugung einer bestimmten Rezeptorkonstellation zu einem bestimmten histologischen Typ oder Differenzierungsgrad des Tumors nicht belegt werden.

Die Entwicklung von Nachweismethoden des Östrogenrezeptors mit Hilfe monoklonaler Antikörper eröffnet neue Perspektiven zur gezielten Lokalisation der Rezeptorproteine und zur Differenzierung heterogener Tumorphypothesen (im-

munocytochemischer Assay). Der enzymimmunochemische Östrogenrezeptornachweis weist weniger inhärente methodische Schwierigkeiten und eine größere Reproduzierbarkeit als das herkömmliche Dextrankohleadsorptionsverfahren auf. Deshalb dürfte sich diese Methode auf Grund der guten Korrelation zum DCC-Assay als der optimalere Weg für den Rezeptornachweis herausstellen.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALLEGRA, J.C., LIPPMAN, M.E., THOMPSON, E.B.:
Estrogen receptor status: An important variable in
predicting response to endocrine therapy in advanced
metastatic breast cancer
Eur. J. Cancer 16, 323 (1980)
2. BACHMANN, F.:
Gestagentherapie bei hormonsensitiven gynäkologischen
Tumoren
Strahlentherapie 155, 690 (1979)
3. BEATSON, G.T.:
On the treatment of inoperable cases of carcinoma of
the mamma: Suggestions for a new method of treatment
with illustrative cases
Lancet II, 104 (1896)
4. BERQVIST, A., KULLANDER, S., THORELL, J.:
A study of estrogen and progesterone cytosol receptor
concentration in benign and malignant ovarian tumors
and a review of malignant ovarian tumors treated
with medroxyprogesterone acetate
Acta Obstet. Gynecol. Scand. (Suppl.) 101, 75 (1981)
5. BOJAR, H., ERTL, D.:
Comparison of immunocytochemical estrogen receptor
assay (ER - ICA), biochemical estrogen receptor enzy-
me immunoassay (ER - EIA), and radioligand binding
assay (ER - RBA) in human breast cancer
Kongreßband Symposion on estrogen receptor determina-
tion with monoclonal antibodies Monte Carlo 12/1984
Fa. Abbott

6. BONTE, J., IDE, P., BILLIET, G., WYNANTS, P.:
Tamoxifen as a possible chemotherapeutic agent in
endometrial adenocarcinoma
Gynecol. Oncol. 11, 140 (1981)
7. CARLSON, J.A., ALLEGRA, J.C., DAY, T.G.,
WITTLIFF, J.L.:
Tamoxifen and endometrial carcinoma: Alterations in
estrogen and progesterone receptors in untreated pa-
tients and combination hormonal therapy in advanced
neoplasia
Am. J. Obstet. Gynec. 149, 149 (1984)
8. COLE, M.P., JONES, C.T.A., TODD, J.D.H.:
A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer
Br. J. Cancer 25, 270 (1971)
9. CREASMAN, W.T., Mc CARTY, K.S., Sr., BARTON, T.K.,
Mc CARTY, K.S., Jr.:
Clinical correlates of estrogen- and progesterone-
binding proteins in human endometrial adenocarcinoma
Obstet. Gynec. 55, 363 (1980)
10. CREASMAN, W.T., SASSO, R.A., WEED, J.C.,
Mc CARTY, K.S.:
Ovarian carcinoma: Histologic and clinical correlation
of cytoplasmic estrogen and progesterone binding
Gynecol. Oncol. 12, 319 (1981)

11. De SOMBRE, E.R., THORPE, S.M., ROSE, C., KING, W.J.:
Correlation of ER-ICA with quantitative ER assays and
time to recurrence in breast cancer
Kongreßband Symposion on estrogen receptor determina-
tion with monoclonal antibodies Monte Carlo 12/1984
Fa. Abbott
12. EHRLICH, C.E., YOUNG, P.C., CLEARY, R.E.:
Cytoplasmic progesterone and estradiol receptors in
normal, hyperplastic, and carcinomatous endometria:
Therapeutic implications
Am. J. Obstet. Gynec. 141, 539 (1981)
13. EIERMANN, W., EICHER, W.:
Die endokrine Therapie des metastasierenden Mamma-
karzinoms unter Berücksichtigung der Steroidrezept-
torenbestimmung
Gynäkol. Prax. 5, 479 (1981)
14. EIERMANN, W., JAWNY, J.:
Steroidhormonrezeptoranalysen im Mammakarzinom:
Ergebnisse und Empfehlungen eines Einsendelabors
Bayer. Ärzteblatt 7, 538 (1982)
15. ENGELSMAN, E., PERSIJN, J.P., KORSTEN, C.B.,
CLETON, F.J.:
Oestrogen receptors in human breast cancer tissue
and response to endocrine therapy
Br. Med. J. II, 750 (1973)
16. ERDOS, T., BEST-BELPOMME, M., BESSADA, R.:
A rapid assay for binding estradiol to uterine
receptors
Anal. Biochem. 37, 244 (1970)

17. FOLCA, P.J., GLASCOCK, R.F., IRVING, W.T.:
Studies with tritium labelled hexestrol in advanced
breast cancer
Lancet II, 796 (1961)
18. GALLI, M.C., De GIOVANNI, C., NICOLETTI, G., GRILLI,
S., NANNI, P., PRODI, G., GOLLA, G., ROCCHETTA, R.,
ORLANDI, C.:
The occurrence of multiple steroid hormone receptors
in disease-free and neoplastic human ovary
Cancer 47, 1297 (1981)
19. GARDNER, D.G., WITTLIFF, J.L.:
Specific estrogen receptors in the lacting mammary
gland
Biochemistry 12, 3090 (1973)
20. GODEFROI, V.C., BROOKS, S.C.:
Improved gel-filtration method for analysis of
estrogen receptor binding
Anal. Biochem. 51, 335 (1973)
21. GORSKI, J., TOFT, D., SHYAMALA, G., SMITH, D.,
NOTIDES, A.:
Hormone receptors: Studies on the interaction of
estrogen with the uterus
Recent Prog. Horm. Res. 24, 45 (1968)
22. GREENE, G.L., NOLAN, C., ENGLER, J.P., JENSEN, E.V.:
Monoclonal antibodies to human estrogen receptor
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5115 (1980)

23. GREENE, G.L., KING, W.J., PRESS, M.F., MILLER, L.S.,
NOLAN, C., De SOMBRE, E.R., JENSEN, E.V.:
The use of monoclonal antibodies to develop immuno-
chemical assays for estrogen receptor in reproductive
cancers
Kongreßband Symposion on estrogen receptor determi-
nation with monoclonal antibodies Monte Carlo 12/1984
Fa. Abbott
24. HADDOW, A., WATKINSON, J.M., PATTERSON, E.:
Influence of synthetic oestrogens upon advanced
malignant disease
Br. Med. J. II, 393 (1944)
25. HÄHNEL, R., KEISALL, G.R.H., MARTIN, J.D., MASTERS,
A.M., Mc CARTNEY, A.J., TWADDLE, E.:
Estrogen and progesterone receptors in tumors of
the human ovary
Gynecol. Oncol. 13, 145 (1982)
26. HAMILTON, T.C., DAVIES, P., GRIFFITHS, K.:
Androgen and oestrogen binding in cytosols of human
ovarian tumours
J. Endocrinol. 90, 421 (1981)
27. HOLT, J.A., CAPUTO, T.A., KELLY, K.M., GREENWALD, P.,
CHOROST, S.:
Estrogen and progestin binding in cytosols of ovarian
adenocarcinomas
Obstet. Gynec. 53, 50 (1979)

28. HOLT, J.A., LYTTLE, C.R., LORINCZ, M.A., STERN, L.S., PRESS, M.F., HERBST, A.L.:
Estrogen receptor and peroxidase activity in epithelial ovarian carcinoma
J. Nat. Cancer Inst. 67, 307 (1981)
29. HORWITZ, K.B., Mc GUIRE, W.L., PEARSON, O.H., SEGALOFF, A.:
Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer: A hypothesis
Science 189, 726 (1975)
30. HUGGINS, C., BERGENSTAL, D.M.:
Inhibition of human mammary and prostatic cancers by adrenalectomy
Cancer Res. 12, 134 (1952)
31. HUNTER, R.E., LONGCOPE, C., JORDAN, V.C.:
Steroid hormone receptors in adenocarcinoma of the endometrium
Gynecol. Oncol. 10, 152 (1980)
32. JÄNNE, O., KAUPPILA, A., SYRJÄLÄ, P., VIHKO, R.:
Comparison of cytosol estrogen and progestin receptor status in malignant and benign tumors and tumor-like lesions of human ovary
Int. J. Cancer 25, 175 (1980 a)

33. JÄNNE, O., KAUPPILA, A., KONTULA, K., SYRJÄLÄ, P.,
VIERIKKO, P., VIHKO, R.:
Female sex steroid receptors in human endometrial
hyperplasia and carcinoma
in: Steroid Receptors and Hormone-dependent Neo-
plasia, New York
Wittliff, J., Dapunt, O., editors
Masson Publishing USA, Inc., p. 37 (1980b)

34. JAWNY, J., JOCHUM, P., EIERMANN, W.:
Sensitivity and optimal performance in steroid
receptor analysis
J. Steroid Biochem. 20, 595 (1984)

35. JAWNY, J., EIERMANN, W., MERL, P.:
Ergebnisse einer Qualitätskontrolle der Rezeptor-
bestimmung
in: Klinische Forschung in der Gynäkologie und
Geburtshilfe
Thieme Stuttgart, S. 39 (1985)

36. JENSEN, E.V.:
Mechanism of estrogen action in relation to
carcinogenesis
Can. Cancer Conf. 6, 143 (1965)

37. JENSEN, E.V., BLOCK, S., SMITH, S., KYSER, K.,
De SOMBRE, E.R.:
Estrogen receptors and breast cancer response to
adrenalectomy
Nat. Inst. Cancer Monograph 34, 55 (1971)

38. JORDAN, V.C., KEENAN, E.J., JACOBSON, H.J.,
Mc CARTY, K.S., Sr.:
Determination of estrogen receptor (ER) in breast
cancer using monoclonal antibody technology: Results
of a multicenter study in the United States
Kongreßband Symposium on estrogen receptor determina-
tion with monoclonal antibodies Monte Carlo 12/1984
Fa. Abbott
39. JUNGBLUT, P.W., HUGHES, S., HUGHES, A., WAGNER, R.K.:
Evaluation of various methods for the assay of
cytoplasmic oestrogen receptors in extracts of
calf uteri and human breast cancer
Acta Endocrin. 70, 185 (1972)
40. KAUPPILA, A., KUJANSUU, E., VIHKO, R.:
Cytosol estrogen and progestin receptors in endome-
trial carcinoma of patients treated with surgery,
radiotherapy, and progestin
Cancer 50, 2157 (1982)
41. KAUPPILA, A., VIERIKKO, P., KIVINEN, S., STENBÄCK,
F., VIHKO, R.:
Clinical significance of estrogen and progestin
receptors in ovarian cancer
Obstet. Gynec. 61, 320 (1983)
42. KING, R.J.B., COWAN, D.M., INMAN, D.R.:
The uptake of (³H-) oestradiol by dimethyl-benzan-
thracene induced rat mammary tumours
J. Endocrinol. 32, 83 (1965)

43. KING, R.J.B.:
Quality control of estradiol receptor analysis:
The United Kingdom experience
Cancer 12, 2822 (1980)
44. KING, W.J., GREENE, G.L.:
Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor
in the nuclei of target cells
Nature 307, 745 (1984)
45. KÖHLER, G., MILSTEIN, C.:
Continuous culture of fused cells secreting antibody
of predefined specificity
Nature 256, 495 (1975)
46. KOENDERS, A., THORPE, S.M.:
Standardization of steroid receptor assays in human
breast cancer: Reproducibility of estradiol and
progesterone receptor assays
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 19, 1221 (1983)
47. KORENMAN, S.G., DUKES, B.A.:
Specific estrogen binding by the cytoplasm of
human breast carcinoma
J. Clin. Endocrinol. Metab. 30, 639 (1970)
48. KRENZER, G., BOQUOI, E.:
Gestagenbehandlung der Endometriumkarzinome
DMW 95, 1863 (1970)
49. KUSS, E.:
Kritische Anmerkungen zur Auswertung von
Rezeptoranalysen
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20, 227 (1982)

50. LECLERCQ, G., BOJAR, H., GOUSSARD, J., PICHON, M.F.,
NICHOLSON, R.A., PIFFANELLI, A., POUSSETTE, A.,
THORPE, S., LONSDORFER, M.:
Results of a multicenter study on ER - EIA Monoclonal
in Europe
Kongreßband Symposium on estrogen receptor determina-
tion with monoclonal antibodies Monte Carlo 12/1984
Fa. Abbott
51. LEUNG, B.S., FLETCHER, W.S., LINDELL, T.D., WOOD,
D.C., KRIPPAEHNE, W.W., PORTLAND, O.:
Predictability of response to endocrine ablation
in advanced breast carcinoma
Arch. Surg. 106, 515 (1973)
52. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L.,
RANDALL, R.J.:
Protein measurement with the Folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
53. LUFT, R., OLIVECRONA, H.:
Experiences with hypophysectomy in man
J. Neurosurg. 10, 301 (1953)
54. MAASS, H., ENGEL, B., HOHMEISTER, H., LEHMANN, F.,
TRANS, G.:
Estrogen receptors in human breast cancer tissue
Am. J. Obstet. Gynec. 113, 377 (1972)
55. MARTIN, J.D., HÄHNEL, R., Mc CARTNEY, A.J.,
WOODINGS, T.L.:
The effect of estrogen receptor status on survival
in patients with endometrial cancer
Am. J. Obstet. Gynec. 1, 322 (1983)

56. MARTIN, P.M. et al.:
Stability of ER antigenic sites and binding sites
in human mammary tumors after a long-term storage
in liquid nitrogen
Kongreßband Symposium on estrogen receptor determina-
tion with monoclonal antibodies Monte Carlo 12/1984
Fa. Abbott
57. Mc GUIRE, W.L., PEARSON, O.H., SEGALOFF, A.:
Predicting hormone responsiveness in human breast
cancer (Chapter three)
in: Estrogen Receptors in Human Breast Cancer
Mc Guire, W.L., Carbone, P.P., Vollmer, E.P., editors
Raven Press , New York (1975)
58. Mc GUIRE, W.L.:
Hormone receptors: their role in predicting prognosis
and response to endocrine therapy
Semin. Oncol. 5, 428 (1978)
59. MILWIDSKY, A., YOUNES, M.A., BESCH, N.F., BESCH,
P.K., KAUFMAN, R.H.:
Receptor-like binding proteins for testosterone
and progesterone in the human ovary
Am. J. Obstet. Gynec. 138, 93 (1980)
60. MOBBS, B.G.:
The uptake of tritiated oestradiol by dimethylbenz-
anthracene-induced mammary tumours of the rat
J. Endocrinol. 36, 409 (1966)

61. MORTEL, R., LEVY, C., WOLFF, J.P., NICOLAS, J.C.,
ROBEL, P., BAULIEU, E.E.:
Female sex steroid receptors in postmenopausal
endometrial carcinoma and biochemical response
to an antiestrogen
Cancer Res. 41, 1140 (1981)
62. MYERS, A.M., MOORE, G.E., MAJOR, F.J.:
Advanced ovarian carcinoma: response to antiestrogen
therapy
Cancer 48, 2368 (1981)
63. NATHANSON, J.T.:
Clinical investigative experience with steroid
hormones in breast cancer
Cancer 5, 754 (1952)
64. PEARSON, O.H., RAY, B.S., HARROLD, C.C.:
Hypophysectomy in treatment of advanced cancer .
J. Am. Med. Assoc. 161, 17 (1956)
65. POLLOW, K., SCHMIDT-GOLLWITZER, M., POLLOW, B.:
Progesterone and estradiol binding proteins from nor-
mal human endometrium and endometrial carcinoma: A
comparative study
in: Steroid Receptors and Hormone-dependent
Neoplasia, New York
Wittliff, J., Dapunt, O., editors
Masson Publishing USA, Inc., p. 69 (1980)
66. QUINN, M.A., PEARCE, P., ROME, R., FUNDER, J.W.,
FORTUNE, D., PEPPERELL, R.J.:
Cytoplasmic steroid receptors in ovarian tumors
Brit. J. Obstet. Gynecol. 89, 754 (1982)

67. RAAM, S., GELMAN, R., COHEN, J.L.:
Estrogen receptor assay: interlaboratory and intra-laboratory variations in the measurement of receptor using dextran-coated charcoal technique
Eur. J. Cancer 17, 643 (1981)

68. SAVLOV, E.D., WITTLIFF, J.L., HILF, R., HALL, T.C.:
Correlations between certain biochemical properties of breast cancer and response to therapy: A preliminary report
Cancer 33, 303 (1974)

69. SCATCHARD, G.:
The attractions of proteins for small molecules and ions
Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660 (1949)

70. SCHWARTZ, P.E., LiVOLSI, V.A., HILDRETH, N., Mac LUSKY, N.J., NAFTOLIN, F.N., EISENFELD, A.J.:
Estrogen receptors in ovarian epithelial carcinoma
Obstet. Gynec. 59, 229 (1982 a)

71. SCHWARTZ, P.E., KEATING, G., Mac LUSKY, N., NAFTOLIN, F.N., EISENFELD, A.J.:
Tamoxifen therapy for advanced ovarian cancer
Obstet. Gynec. 59, 583 (1982 b)

72. SCHWARTZ, P.E., MERINO, M.J., LiVOLSI, V.A., LAWRENCE, R., Mac LUSKY, N., EISENFELD, A.J.:
Histopathologic correlations of estrogen and progesterin receptor protein in epithelial ovarian carcinoma
Obstet. Gynec. 66, 428 (1985)

73. SIITERI, P.K.:
Steroid hormones and endometrial cancer
Cancer Res. 38, 4360 (1978)

74. TEUFEL, G., GEYER, H., de GREGORIO, G., FUCHS, A.,
KLEINE, W., PFLEIDERER, A.:
Östrogen- und Progesteronrezeptoren in malignen
Ovarialtumoren
Geburtsh. Frauenheilk. 43, 732 (1983)

75. TOBIAS, J.S., GRIFFITHS, C.T.:
Management of ovarian carcinoma: Current concepts
and future prospects
N. Engl. J. Med. 294, 877 (1976)

76. TOFT, D., GORSKI, J.:
A receptor molecule for estrogen: Isolation from the
rat uterus and preliminary characterization
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55, 1574 (1966)

77. WARD, H.W.C.:
Progestogen therapy for ovarian carcinoma
J. Obstet. Gynaecol. Brit. Commonw. 79, 555 (1972)

78. WARD, H.W.C.:
Anti-oestrogen therapy for breast cancer: A trial
of Tamoxifen at two dose levels
Br. Med. J. 1, 13 (1973)

79. WELSHONS, W.V., LIEBERMAN, M.E., GORSKI, J.:
Nuclear localization of unoccupied oestrogen
receptors
Nature 307, 474 (1984)

80. WILLCOCKS, D., TOPPILA, M., HUDSON, C.N., TYLER, J.P.P., BAIRD, P.J., EASTMAN, C.J.:
Estrogen and progesterone receptors in human ovarian tumors
Gyn. Onc. 16, 246 (1983)
81. WITTLIFF, J.L., FISHER, B., DURANT, J.R.:
Establishment of uniformity in steroid receptor analysis used in cooperative clinical trials of breast cancer treatment
Recent Results Cancer Res. 71, 198 (1980)
82. WITTLIFF, J.L., BROWN, A.M., FISHER, B.:
Establishment of uniformity in steroid receptor determinations for protocol B-09 of the National Surgical Adjuvant Breast Project
in: Estrogen Receptor Assays in Breast Cancer
Sarfaty, G.A., Nash, A.R., Keightly, D.D., editors
Masson Publishing USA, pp. 27 (1981)
83. YOUNG, P.C.M., EHRLICH, C.E., CLEARY, R.E.:
Progesterone binding in human endometrial carcinomas
Am. J. Obstet. Gynec. 125, 353 (1976)

LEBENS LAUF

28. Dezember 1960	Geboren in München Eltern: Ludwig Mautner Irmengard Mautner, geb. Feil
1967 - 1971	Besuch der Volksschule in München-Großhadern
1971 - 1980	Besuch des Ludwigsgymnasiums in München, Humanistischer Zweig
27. Juni 1980	Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife
WS 1980/81	Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Seit SS 1981	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. W. Eiermann. Er hat mir das Thema der Arbeit überlassen und stand mir stets hilfreich zur Seite.



